

成体エリスロポエチン欠損貧血モデルマウスの樹立 と腎臓エリスロポエチン産生細胞の機能解析

著者	山? 瞬
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/56071

博士論文

成体エリスロポエチン欠損貧血モデルマウスの樹立
と腎臓エリスロポエチン産生細胞の機能解析

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

生体機能学講座 医化学分野

山寄 瞬

目次

1. 要約	P1
2. 研究背景	P3
3. 研究目的	P8
4. 研究方法	P9
5. 研究結果	P15
6. 考察	P29
7. 結論	P37
8. 参考文献	P38
9. 図	P45
10. 表	P64
11. 謝辞	P67

1. 要約

赤血球産生は造血ホルモンであるエリスロポエチン（Epo）により精巧に調節され、組織への酸素供給の維持にはたらく。哺乳類の発生段階において、造血組織の変化に伴い、主要 Epo 産生臓器は肝臓から腎臓へと切り替わる。胎生期には、肝実質細胞により産生される Epo が、胎児肝自身の造血をパラクラインシグナルにより支持する。造血の場が骨髄へと変化する出生前後になると、腎臓の傍尿細管間質部位に位置する REP（renal Epo-producing）細胞による Epo の分泌が始まる。このような組織特異性に加えて、成体では出血や低酸素曝露により腎臓と肝臓の Epo 分泌が促進され、ストレス造血を引き起こすことで酸素供給の改善が達成される。このような組織特異的かつ低酸素・貧血誘導的な Epo 産生は、*Epo* 遺伝子の転写が厳密な制御を受けることによって成立する。今回、Epo の産生制御と造血機能を個体レベルで研究するため、私は *Epo* 遺伝子の制御を操作することにより、成体発症型の Epo 欠損貧血モデルマウスを樹立した。この遺伝子改変マウスは、肝臓において Epo を発現するが、腎臓の Epo 産生を欠失した。そのため、主要 Epo 産生臓器が肝臓から腎臓に切り替わる離乳期的前後において、このマウスは Epo 欠損貧血を発症し、組換え Epo 製剤の投与によりこの貧血は回復した。私は、このマウス系統を ISAM（遺伝性超貧血マウス, inherited super anemic mouse/mice）と命名した。重度の慢性貧血により、*Epo* 遺伝子の制御領域下で調節される GFP と Cre の発現を誘導することができ、腎臓の Epo 産生細胞を極めて

効率的に標識することに成功した。これらのマウスの解析により、腎内の皮質及び髄質外層の線維芽細胞の大多数が生来的に Epo を産生する能力を持つことを明らかにした。また、ISAM の骨髄を用いたマイクロアレイ解析により、新規の Epo 標的遺伝子群の存在を明らかにした。さらに、一側尿管結紮 (UUO) モデルを用いた実験から、腎線維化は REP 細胞を主な起源とする筋線維芽細胞により形成されることを明らかにした。以上の結果から、ISAM は赤血球造血刺激薬剤の評価や、Epo 産生細胞の生理的または病的状態における動的変化の追跡に役立つ有用なツールであることを示した。

2. 研究背景

赤血球産生は造血ホルモンであるエリスロポエチン (Epo) により精巧に調節され、これにより組織への酸素供給が維持される¹。Epo は、未熟な赤血球系細胞に発現する Epo 受容体 (EpoR) に結合すると、JAK2-STAT5 シグナル経路を介して下流の標的遺伝子の発現を誘導し、赤血球分化・増殖・抗アポトーシス効果を発揮する²。哺乳類の発生段階において、造血組織の変化に伴い、主要な Epo 産生臓器は肝臓から腎臓へと切り替わる³⁻⁵。胎生期には、肝実質細胞により産生される Epo が、胎児肝自身の造血をパラクラインシグナルにより助ける⁵。造血の場が骨髄へと変化する出生前後になると、腎臓の傍尿細管間質部位に位置する REP (renal Epo-producing) 細胞による Epo の分泌が始まる⁶。このような組織・細胞特異性に加え、成体では出血や酸素濃度低下により腎臓と肝臓の Epo 分泌が亢進し、ストレス造血を引き起こすことで組織への酸素供給の改善が達成される^{7,8}。

組織特異的かつ低酸素・貧血誘導的な Epo の産生は、*Epo* 遺伝子の転写レベルにおいて厳格に制御される^{7,8}。肝臓における *Epo* 遺伝子の発現は、低酸素誘導性転写因子 (HIF) が遺伝子下流の低酸素応答性配列 (HRE) へ結合することで転写が活性化される⁹⁻¹¹。当研究室の大腸菌人工染色体 (BAC) を用いたトランスジェニックマウス解析から、この *Epo* 遺伝子の 3'エンハンサー (EpoE-3') は肝実質細胞における

低酸素誘導的な転写活性化に必要十分であることが示された⁵。一方で、腎臓の *Epo* 発現制御に *EpoE-3'* は必須ではなく、独立した異なる制御領域の存在が示唆されている^{12, 13}。また、当研究室の BAC トランスジェニックマウス解析は、転写開始点の 30 塩基対上流に位置する GATA 配列が、異所性発現の恒常的な抑制に必須であることを明らかにしている¹⁴。

腎臓における *Epo* の発現は、皮髄境界の周辺に位置する線維芽細胞様の間質細胞に限定され¹⁴⁻¹⁷、私達のグループはこの細胞を REP 細胞と呼んでいる。これまでに REP 細胞の特異的なマーカーは同定されていないが、当研究室では遺伝子改変マウスを駆使することで REP 細胞の GFP（緑色蛍光タンパク質）レポーターシステムを展開させてきた。これにより、REP 細胞が神経系の特徴を持つこと、また尿細管や血管に沿って伸ばした突起により REP 細胞同士がネットワークを形成することが明らかにされた^{6, 14, 17}。さらに、新生仔貧血を呈するマウスの腎臓から、GFP 標識された REP 細胞を単離して解析することが可能となった⁶。しかしながら、成体における REP 細胞の性状や *Epo* 遺伝子制御の分子基盤について、いまなお不明な点は多く残されている。その原因の一部として、*Epo* 発現細胞の数は貧血・低酸素刺激の程度に応じて一過性に増える性質のため、同定できる REP 細胞の効率には限界がある点が挙げられる^{14, 18, 19}。このため、*Epo* を産生する能力や REP 細胞としての特性が、腎臓の全ての

間質細胞に備わっているのか、それともその一部の集団に限られているのか明らかではない^{18,19}。

慢性腎臓病（chronic kidney disease, CKD）の進行に伴い腎線維化が生じると、Epo の分泌量が不足し、Epo 依存性の貧血（腎性貧血）が引き起こされる²⁰。しかし、Epo 産生能が低下する機序について、REP 細胞が消失するのか、あるいは *Epo* 遺伝子発現の障害が起きているのか不明な点は多い。また、腎線維化の際に増殖し、細胞外マトリックスを産生する筋線維芽細胞の由来についても議論が続いている²¹。最近、私達のグループは、腎線維化モデルにおいて REP 細胞が Epo 発現能を失うと同時に、 α SMA 陽性の筋線維芽細胞へと形質転換することを明らかにした（Souma *et al.* in submission）²²。しかしながら、線維化が進行した腎臓において REP 細胞は消失せずに存在するのか、また線維化形成にどの程度貢献しているかについて解析は進んでいない。また、Epo 発現能を失った REP 細胞を追跡することができる実験系については、これまでに確立されていない。

腎性貧血あるいは様々な貧血の治療において、組換え EPO 製剤は 20 年前から幅広く使用されており、最近では新規の赤血球造血刺激製剤（erythropoiesis-stimulating agents, ESAs）が開発されている^{23,24}。しかし、Epo 欠損貧血を再現する適切な動物実験系は樹立されていなく、組換え EPO や ESAs 投与の成体造血に対する効果について、

分子機構や下流標的遺伝子などの十分な解析は行われていない。これまでに、*Epo* または *EpoR* (*Epo* 受容体) 遺伝子の欠失マウスが胎生 12.5 日前後に致死性の貧血を呈することが示され、胎生造血における *Epo*-*EpoR* シグナルの重要性が解明されている^{25, 26}。また、*Epo* あるいは *Hif-2α* 遺伝子の条件付き遺伝子破壊マウスが作成されているが、不十分な遺伝子欠失により中程度の貧血（赤血球数の 20～30%の低下）を呈するにとどまった^{27, 28}。

当研究室の最近の成果により、*EpoE-3'*をホモ接合体で欠失したマウスは、胎生 14 日以降に肝臓の *Epo* 発現が消失するため、周産期に重度の貧血を呈することが明らかにされた⁵。一方で、このマウスは出生前後から開始される腎臓の *Epo* 産生は十分に行う能力があり、周産期の貧血を代償するように *Epo* 発現量は増加する。このため、出生後 2 週までに貧血は改善し、成体では正常な造血レベルを維持する。私はこの知見を基に、トランスジェニック相補レスキュー手法を活用して、成体 *Epo* 欠損貧血のモデルマウスを開発しようと考えた。

本研究では、抑制性の *GATA* 配列と肝臓特異的エンハンサー *EpoE-3'*の制御下で *Epo* を発現するが腎臓では発現しないと予想されるトランスジーンを導入することで、*Epo* 遺伝子欠失マウスを胎生致死からレスキューした。出生後に腎臓 *Epo* 発現を失い *Epo* 欠損貧血を引き起こすという私の仮説に従い、成体発症型の重度貧血（赤血球数

60%低下)と検出限界レベルの血漿 Epo を示すレスキューマウス系統を樹立することに成功した。私はこのマウス系統を ISAM (遺伝性超貧血マウス, inherited super anemic mouse/mice) と命名した。私は ISAM を利用することで、成体における Epo の産生制御と造血機能についての研究に取り組んだ。その結果、ISAM の腎臓を用いた解析により、腎臓の皮質および髄質外層に広がる大多数の間質線維芽細胞が、潜在的に Epo 産生能を持つ REP 細胞であることを明らかにした。また、成体骨髄造血における Epo の機能的役割を担う遺伝子群を同定した。さらに、一側尿管結紮 (UUO) モデルを用いた実験から、腎皮質の線維化は、REP 細胞を主な起源とする筋線維芽細胞により形成されることを明らかにした。

3. 研究目的

本研究では、Epo 欠損マウスに対して肝臓特異的な Epo 発現を用いたトランスジェニック相補レスキュー手法を行い、成体 Epo 欠損貧血のモデルマウスを作成することを目的とした。また、この Epo 欠損貧血モデルマウスを利用し、1) 成体造血における Epo シグナルの下流遺伝子群の同定、2) 腎内における Epo 産生能の存在範囲の解明、および 3) 腎線維化における REP 細胞の寄与についての検討、の 3 点を目的とした。

4. 研究方法

トランスジーン構築の作成

マウス *Epo* 遺伝子を含む周辺領域を、制限酵素部位の *Cl*aI (転写開始点から上流 3.3-kb) と *B*amHI (下流 4.5-kb) を用いて pBluescript II (Agilent Technologies) にクローニングした。また、*E*coRI による切断とセルフライゲーションにより 310 塩基対断片を欠失させ、内在性 *Epo* 遺伝子との区別利用した (図 1a 参照)。このプラスミド DNA から 3.3K-*Epo*3' トランスジーン構築を単離し、BDF1 受精卵に対してマイクロインジェクションを行い、11 系統の 3.3K-*Epo*3' トランスジェニックマウスを樹立した。

Epo-*Cre* トランスジーン構築は、マウス *Epo* 遺伝子周辺 180-kb を含む BAC (大腸菌人工染色体) クローンに、大腸菌内相同組換えの手法により *Cre* cDNA (pBS185 由来、Gibco) を導入して作成した (図 13a 参照)¹⁴。また第 I エクソンの開始コドンに変異を導入して、*Cre* cDNA の開始コドンから翻訳されるようにした。組換えた BAC クローンは、制限酵素消化とシーケンス解析により確認し、CsCl 超遠心法により環状 BAC DNA として精製した²⁹。

遺伝子改変マウス

直鎖状の 3.3K-*Epo*3' トランスジーン構築と環状の *Epo*-*Cre* トランスジーン構築を、

BDF1 受精卵に対してマイクロインジェクションを行い、11 系統の *3.3K-Epo3'* トランスジェニックマウスと 3 系統の *Epo-Cre* トランスジェニックマウスを樹立した。*Epo* ノックアウトマウス (C57BL/6 遺伝背景) は、当研究室で以前に樹立され、*Epo* 遺伝子の第 2~4 エクソンが *GFP* cDNA に置換されている⁶。レスキュー実験で得られた産仔の尾や指からゲノム DNA を回収し、*Epo* 遺伝子のノックアウトアレルとトランスジーンを PCR により検出した。*Epo* 遺伝子の野生型アレルは、3' UTR (非翻訳領域, untranslated region) 内の C57BL/6 特異的な配列をプライマーに用いて検出し、129/Sv ゲノムに由来するノックアウトアレルとトランスジーン of 構築からは検出されない。*Rosa26-STOP-tdTomato* マウス³⁰ は、米国ジャクソン研究所から購入した (Stock No. 007908)。トランスジーンのコピー数は、ABI7300 (Applied Biosystems) と SYBR Green 試薬 (Eurogentec, Seraing, Belgium) を用いたゲノム DNA の定量 PCR により決定した。遺伝子型決定及びコピー数解析に用いたプライマーの配列は、表 1 にまとめた。全ての動物実験は、東北大学動物実験専門委員会の承認の下行われた (承認番号 2012 医動-143)。

血液解析と貧血誘導

末梢血は後眼窩神経叢あるいは顎下静脈から採取し³¹、全自動血球計数器 (日本光電,

東京) により測定した。末梢血スメアは、ライトギムザ染色により形態を観察し、ニューメチレンブルー染色により網状赤血球数を測定した。貧血を誘導するために、解析の48、24及び6時間前に末梢血約0.4 mlを瀉血した。血漿中のEpo濃度は、Quantikine Mouse Epo ELISA kit (R&D systems) を用いて測定した。

RT-PCR

ISOGEN (ニッポンジーン, 大阪) により組織から全RNAを抽出し、SuperScript III とランダムプライマー (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。逆転写産物の定量PCR (定量 RT-PCR) は、ABI7300 (Applied Biosystems) を用いて行い、内部標準には18S rRNAの発現レベルを用いた。*Epo* 及び *Epo-GFP* mRNA の発現レベルは、明示している場合を除いて、複数の貧血状態の *Epo*^{+/-}マウス腎臓の cDNA の混合物を標準サンプルとして100に設定したときの相対値で表示した。トランスジーンと内在性の *Epo* mRNA は、特異的なプライマーを用いた半定量 RT-PCR によって区別し、*HPRT* mRNA の発現を内部標準として扱った。RT-PCR 解析に用いたプライマーとプローブの配列情報は、表2にまとめた。

フローサイトメトリー解析

赤血球細胞の解析は、骨髄と脾臓から単一細胞懸濁液を調製し、FITC 標識抗 CD71 (クローン R17217, 製品番号 11-0711-85)、PE 標識抗 Ter119 (クローン TER-119, 製品番号 12-5921-83)、APC 標識抗 c-Kit (クローン 2B8, 製品番号 17-1171-83)のモノクローナル抗体 (eBioscience) と氷上で 30 分間染色反応させた。REP 細胞を含む腎臓の細胞懸濁液は、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) による灌流後の腎臓を細かく刻み、Liberase TM (終濃度 0.26 U/ml, Roche) による酵素消化を 37℃で 2 時間反応させた後に、40 μ m のフィルターを通すことで調製した。PI (propidium iodide) により死細胞の染色を行った後、FACS Canto II、FACS Aria II 及び FACS Diva ソフトウェア (Becton Dickinson) を用いて FACS 解析を行った。

組織学的解析

マイルドホルム (Wako、東京) により固定した組織をパラフィン包埋した後、5 μ m の厚さに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) により染色した。蛍光組織染色には、組織を 4%パラホルムアルデヒドにより 4℃で 2 時間固定し、ティッシュ・テック OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン、東京) に包埋した。20 μ m の厚さの凍結切片を作成し、ニワトリ抗 GFP、ウサギ抗 CD31 ポリクローナル抗体 (Abcam)、ラット抗 CD73、ラット抗 PDGFR β モノクローナル抗体 (BD Pharmingen)、

ビオチン化 LTL (*Lotus tetragonolobus* lectin, Vector laboratories) と 4°C で一晩反応させた。その後、Alexa Fluor 488 標識抗ニワトリ、Alexa Fluor 555 標識抗ウサギあるいは抗ラット、Alexa Fluor 350 標識ストレプトアビジン (Molecular Probes) と室温で 1 時間反応させた。筋線維芽細胞の染色には FITC 標識マウス抗 α SMA モノクローナル抗体 (Sigma) を用いた。蛍光画像の取得は、共焦点顕微鏡 LSM510 META (Carl Zeiss, Heidelberg) を用いて行った。

Epo 中和抗体とヒト組換え EPO の投与

マウスの Epo の活性を中和するため、200 μ g の抗マウス Epo モノクローナル抗体あるいはアイソタイプ抗体 (R&D systems) を、1 日おきに 12 日間腹腔内に投与した。Epo の投与実験では、体重 kg 当たり 3,000 単位のヒト組換え EPO 製剤 (rHuEPO, 中外製薬) を、1 日おきに 12 日間腹腔内に投与した。

マイクロアレイ解析

マウス骨髄の全 RNA に対して Quick Amp Labeling Kit (1 カラー用, Agilent Technologies) を用いて cDNA 合成と Cy3 蛍光色素のラベル化 cRNA 生成を行った。調製したサンプルを Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (4 x 44K, Agilent

Technologies) にハイブリダイズさせ、アジレント DNA マイクロアレイスキャナによりデータを取得した。得られたデータは、GeneSpring ソフトウェア (Silicon Genetics) を用いて解析した。ヒートマップ解析には、Cluster 3.0 と JAVA Treeview ソフトウェアを用いた。

腎臓線維化モデル

腎臓の線維化を誘導するために、一側尿管結紮 (UUO, unilateral ureteral obstruction) モデルを用いた。ペントバルビタールによる麻酔後、左側腹部を切開した。左尿管を剥離し、2 カ所で結紮後、その間で尿管を切断した。尿管結紮後 5 日、14 日に結紮側 (UUO) および対側 (No-UUO) の腎臓を解析した。

統計解析

全てのデータは平均 \pm 標準偏差 (s.d.) で表示した。群間の比較にはペアのない t 検定を用いた。P 値が 0.05 未満のときに統計学的に有意な差があると判断した。

5. 研究結果

1, 肝臓エンハンサーを用いたトランスジェーンにより *Epo* 遺伝子欠失マウスを胎生致死からレスキューした

肝臓特異的な *Epo* 発現を得るため、*Epo* 遺伝子上流 3.3-kb から肝臓特異的エンハンサーを含む下流 4.5-kb までの 8-kb 領域をクローニングした。また、内在性 *Epo* 遺伝子と区別するために 3' UTR 内に 0.3-kb 領域の欠失を導入し、トランスジェーン構築 (*3.3K-Epo3'*) を作成した (図 1a, *Tg*)。マイクロインジェクションを行い、様々な *Tg* のコピー数を持つ 11 系統のトランスジェニックマウスを樹立した (表 1)。これらのマウスを、*Epo* 遺伝子の翻訳領域が *GFP* cDNA に置換されたノックアウトアリル (図 1a, *KO*) を持つ *Epo*^{+/-}マウスと繰り返し交配した (図 1b)。*Epo*^{+/-}マウスと *Epo*^{+/-}:*Tg* マウスの交配から、*Epo*^{-/-}:*Tg* マウスが出生するか PCR 解析により検討した。その結果、9 系統において *Tg* により *Epo*^{-/-}マウスの致死性が回避されることを明らかにした (表 1)。レスキューマウス (*Epo*^{-/-}:*Tg*) は、野生型 (*WT*) アリルを欠失するが、*KO* アリルと *Tg* を持つことが確認された (図 1c)。

Epo^{-/-}マウスは、胎生 13 日頃までに胎仔肝臓の造血障害により死亡することが示されている^{25,25}。これらの報告に一致して、*Epo*^{-/-}胎仔は重度の貧血を呈し、胎生 12.5 日頃に死亡した (図 2a)。一方で、レスキューマウスは *Tg* により肝臓の造血が維持さ

れ、致死性の貧血から回復した（図 2a）。次に、レスキューマウスの *Epo* mRNA 発現レベルを、内在性および *Tg* 由来の両方の *Epo* mRNA を検出するプライマーを用いて、定量 RT-PCR 法により解析した。その結果、胎生 12.5 日のレスキューマウスの肝臓および他の身体領域から *Epo* mRNA 発現を検出したが、*Epo*^{-/-}胎仔からは検出できなかった（図 2b,c）。このレスキューマウスの胎仔肝臓における *Epo* mRNA は *Tg* 由来であることを、特異的なプライマーを用いた RT-PCR により確認した（図 2d）。また、レスキューマウスの肝臓の *Tg* 発現レベルは、*Epo*^{+/-}:*Tg* マウスの発現よりも高いことを見出し、胎仔肝臓における誘導的な発現制御が示唆された（図 2d）。さらに、成体レスキューマウスに対して貧血刺激を負荷すると、肝臓において *Tg* による *Epo* mRNA 発現レベルが上昇した（図 3a）。これらの結果から、*3.3K-Epo3'*トランスジーンに含まれる *Epo* 遺伝子近傍の制御領域は、胎仔および成体の肝臓における低酸素・貧血誘導的な発現制御に十分な活性を持つことが示された。

Epo^{-/-}:*Tg*⁴⁷⁶ と *Epo*^{+/-}の胎仔肝臓の *Epo* mRNA 発現レベルは同程度であったが、*Epo*^{-/-}:*Tg*⁴⁵⁸ および *Epo*^{-/-}:*Tg*⁴⁷⁵ 胎仔の肝臓の発現レベルは、それぞれコントロール (*Epo*^{+/-}肝臓) の 20%と 2%と低かった（図 2b）。これらのレスキューマウスが胎仔肝臓の造血を維持していたことから（図 2a）、異所性の *Tg* 発現が造血を支持した可能性が推測された（図 2c）。実際に、成体レスキューマウスでは様々な臓器において恒常

的な *Tg* 発現が認められた (図 3a)。この過剰産生された *Epo* により、6 系統のレスキューマウスが多血症を引き起こした (図 3b)。多血症レスキューマウスの血漿には、コントロールマウスよりも有意に高い濃度の *Epo* を認めた (図 3c)。これらの結果は、*Epo* 遺伝子近傍の制御領域が異所性・恒常的な *Epo* 発現を抑制するのに十分ではないことを示している。

2. 成獣において *Epo* 重度欠損による貧血を呈する 458 系統のレスキューマウス

458 系統のレスキューマウス ($Epo^{-/-};Tg^{458}$) は、成体において重度の貧血を呈し (図 4a)、他のレスキュー系統よりも顕著に低い Hct を示すことを見出した (図 3b)。このレスキューマウスの胎生期の造血に、明らかな異常は見られなかった (図 2a)。驚くべきことに、これらのマウスの血漿 *Epo* 濃度は、ELISA による検出限界前後のレベルであった (図 3c)。私は、この成体発症型の貧血を示す 458 系統のレスキューマウスを、新規の *Epo* 欠損貧血モデルとして注目し、以降の解析を進めた。以下、この $Epo^{-/-};Tg^{458}$ マウスを ISAM (遺伝性超貧血マウス, inherited super anemic mouse/mice) と呼ぶ。

ISAM の末梢血スミアにおいて赤血球の形態に異常は認められず (図 4b)、平均赤血球容積 (MCV, mean corpuscular volume) と平均赤血球血色素量 (MCH, mean

corpuscular hemoglobin) は正常範囲内であった (図 4c)。また、白血球数や血小板数は正常であった (図 4d)。重度の貧血にも関わらず、網状赤血球の割合は ISAM とコントロールマウスで同程度であった (図 4e)。これらの結果は、Epo 欠損により起こる低増殖性の正球性正色素性貧血の症状と一致した²⁰。また、血中尿素およびクレアチニンレベルや腎臓組織は、ISAM とコントロールマウスで同程度であり、腎機能低下による貧血ではないことが示されている (Souma *et al*, in submission)。

3. ISAM は腎臓の Epo 産生を消失し離乳期に Epo 欠損貧血を進行する

通常のマウスは出生後、成長に伴い赤血球数と Hct を増加させ、8 週齢までにはほぼ一定のレベルに到達する (図 5a,b)。ISAM はコントロールマウスと同程度の体重増加を示したが、生後 2 週までしか赤血球を増やすことができず、その後貧血を進行させた (図 5a,b)。ISAM の血漿 Epo 濃度は、2 週齢以降にほぼ検出限界前後のレベルに低下し、一方、コントロールマウスの血漿 Epo 濃度は造血亢進に一致するように出生後一過的に上昇した (図 5c)。また、 $Epo^{+/-};Tg^{458}$ マウスの赤血球数と Hct は正常レベルであることから、貧血が Tg 挿入による遺伝子変異により引き起こされた可能性は低いと考えられた。

次に、ISAM における肝臓から腎臓への Epo 産生臓器の切り替わりについて検討

した。出生後 7 日の時点では、ISAM の肝臓における *Epo* mRNA は、コントロールマウスの肝臓よりも高く発現していた (図 5d)。このとき、コントロールマウスの腎臓において *Epo* mRNA の発現を認めたが、ISAM の腎臓では検出されなかった (図 5e)。この結果から、腎臓 *Epo* 発現の消失を代償するために ISAM の肝臓において *Tg* の発現が誘導されたことが示唆された。

通常の成獣マウスにおいて、*Epo* mRNA 発現は腎臓に特異的に検出され、肝臓における発現は不活性化されている (図 5f)。成獣 ISAM は、*Epo* mRNA は肝臓で検出され、腎臓では検出されなかったことから、貧血低酸素による肝臓の *Tg* 発現の誘導が示唆された (図 5f)。実際に、組換え EPO (rHuEPO) 投与により貧血から回復させた ISAM の肝臓において、*Epo* mRNA の発現は検出限界以下のレベルに低下した (図 5g)。しかしながら、この肝臓の *Epo* 発現レベルは、通常マウスの腎臓の発現レベルよりも低く、ISAM の造血を支持するには不十分であると考えられた。また、ISAM の脳において恒常的な *Epo* mRNA の発現が観察された (図 5f,g)。しかし、血液脳関門の存在により、脳で産生された *Epo* が血中へと分泌されているかは不明である^{7,32}。これらの結果をまとめると、*3.3K-Epo3'*トランスジーンの発現により *Epo* 遺伝子欠失マウスの致死性は十分に回避されるが、成体の ISAM は腎臓 *Epo* 産生および腎外組織からの代償的 *Epo* 分泌を失うため *Epo* 欠損貧血を発症する。

4. ISAM は遺伝学的に慢性的 Epo 欠損貧血を再現する

ISAM を用いて複数の交配実験を行ったところ、ISAM の雄と雌の両者において繁殖能は正常であり、また ISAM は概ね期待値に従って出生した (表 2)。ISAM の貧血の表現型は、複数のマウス世代において安定に再現された (図 6a)。ISAM 同士の交配から、*Tg* をホモ接合体に持つ ISAM ($Epo^{-/-}:Tg^{458/458}$) が得られ、同様に重度の Epo 欠損貧血 (図 6b) と正常な繁殖能を示した (表 2)。大半の ISAM の寿命は 1 年以上であり、重篤な貧血は 6 ヶ月齢および 12 ヶ月齢において持続する (図 6c)。ISAM の貧血は、雌よりも雄の方が、また若齢よりも老齢の方が、わずかであるが有意に重度であったが (図 6c)、その原因については不明である。血漿 Epo 濃度は 12 ヶ月齢において検出限界前後のレベルであり (図 6d)、成獣期を通して Epo 欠損が持続することを示唆した。また、ISAM は心臓の拡大が見られ (図 6e,f)、貧血を代償するための心拍出量増大によって引き起こされたと考えられる³³。これらの結果により、ISAM は慢性重度貧血を遺伝学的に再現する動物モデルとして重要な表現型を示すことを明らかにした。

5. Epo 重度欠損によって引き起こされる成体マウスにおける造血障害

次に ISAM の Epo 欠損が成体造血に与える影響について解析した。ISAM の大腿骨の遠位側はコントロールマウスよりも白かった (図 7a)。骨髓の組織像は正常な所見であったが、全細胞数はコントロールマウスに比べて有意に減少した (図 7b,c)。また、もう一つの造血臓器であり、ストレス造血において骨髓よりも貢献の大きいとされる脾臓^{34,35}について解析した。瀉血で誘導した貧血状態のコントロールマウスは、代償的なストレス造血のため脾臓の拡大を認めた (図 7a)。一方、ISAM の脾臓の大きさと重量は、重度の貧血にも関わらずほぼ正常レベルのままであった (図 7a,d)。また、ISAM の脾臓は、組織像における脾構築の変化は見られないものの、細胞数は減少した (図 7b,c)。

フローサイトメトリーを用いて、ISAM とコントロールマウスの赤血球成熟を CD71 (トランスフェリン受容体) と Ter119 の発現により 4 つの赤芽球画分 (図 8a、I, II, III および IV) に分けて解析した^{36, 37}。その結果、ISAM の骨髓において画分 I ($CD71^{high}/Ter119^{low}$, 前赤芽球) と画分 II ($CD71^{high}/Ter119^{high}$, 好塩基性赤芽球) の細胞数が著しく減少した (図 8a,b)。これらの早期赤芽球は ISAM の脾臓においても減少する傾向であったが、有意ではなかった。また、CFU-E 前駆細胞を含む $CD71^{high}/Ter119^{-}/c-Kit^{+}$ 画分³⁷の細胞数は、ISAM の骨髓と脾臓において明らかな変化を認めなかった (図 8c,d)。これは、胎生期や新生仔期における Epo 欠損が、赤血球

前駆細胞の分化と増殖は変化せずに赤芽球が減少するという以前の報告と一致する^{5, 25, 38}。これらの結果から、重度 Epo 欠損によって Epo 反応性の段階の赤芽球が減少し、造血障害が引き起こされることが明らかとなった。それに加えて、Epo 欠損による造血への影響は、脾臓よりも骨髄において大きい可能性が示された。

6. ISAM は内在性及び外来性 Epo に依存した造血反応を示す

ISAM において低レベルながら Epo が分泌され、末梢に循環しているのかを明らかにするため、Epo に対する中和抗体を一日おきに腹腔内投与した。その結果、Epo 中和抗体を投与して 12 日後に ISAM の Hct 値が顕著に低下し、アイソタイプのコントロール抗体を投与した ISAM では Hct 値は変化しなかった (図 9a)。この結果から、わずかながらも不可欠な量の Epo が ISAM の造血を支持し、生存を可能にすることが示唆された。反対に、ISAM に対して rHuEPO を一日おきに腹腔内投与すると、6 日後に Hct 値が有意に増加し、12 日後には正常なレベルまで回復した (図 9b)。また、網状赤血球の数および割合は投与 6 および 12 日後において有意に増加し (図 9c)、Epo 治療によりストレス造血が誘導されたと考えられた。これらの結果をまとめると、ISAM は内因性及び外因性の Epo に正常に反応し、重度の貧血は単に Epo 欠損に起因するものであることが明らかとなった。また、ISAM は ESA や Epo 依存性の貧血に対

する治療薬を個体レベルで評価するのに適したモデルであることが示された。

7. ISAM の骨髄を用いた新規 Epo 反応性遺伝子の同定

ISAM の Epo 欠損状態を利用して、rHuEPO 投与後に造血細胞で誘導される遺伝子発現変化を解析した。rHuEPO を投与して 6 時間後の ISAM の骨髄から RNA を回収し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、統計学的に有意で 1.5 倍以上の発現変化を示す約 400 遺伝子を同定し、202 遺伝子は発現上昇し、192 遺伝子は発現低下した (図 10a)。Epo 投与により、赤血球分化に重要な役割を持つ細胞膜骨格、トランスポーター、解糖系酵素、転写因子の遺伝子発現レベルが増加した。これらの発現上昇する遺伝子には、*Cish*、*Gdf3*、*Pim1*、*Tfrc*、*Egr1* および *Podxl* 遺伝子といった以前に Epo 反応性の赤血球系遺伝子として報告されたものが含まれた^{39, 40} (図 10a、白丸)。

また、Epo 刺激は細胞接着因子 (*Itga4*)、細胞外マトリックス (ECM) 再構築にはたらく酵素 (*Hyal1*、*Lox*)、B 細胞分化に関わる因子 (*Aicda*、*Il7r*) の遺伝子発現を低下させた。これらの結果は、Epo が赤血球産生と同時にリンパ球産生や骨代謝を制御する役割を示した最近の研究⁴¹ を支持するものであった。

また、マイクロアレイデータから Epo シグナルにより *Igfbp2*、*Pklr* および *Mmp13* 遺伝子が活性化されるという新規の知見がもたらされた (図 10a、青四角)。そこで、

定量 RT-PCR 法によりこれらの遺伝子の発現誘導を確認したところ、ISAM の骨髄において rHuEPO による誘導が再現されたが、脾臓における誘導は弱く有意ではなかった (図 10b)。この臓器特異的な Epo 反応性は、骨髄と脾臓における Epo 感受性あるいは細胞集団の違いを反映していると考えられた。これらの結果は、ISAM を利用することにより、個体レベルで Epo-EpoR シグナルに制御される遺伝子群を効率的に同定することが可能であることを示している。

8. ISAM の慢性貧血酸素により *Epo* 遺伝子座からの GFP 発現が強く誘導される

Epo 遺伝子座に *GFP* cDNA がノックインされているため、*KO* アリルは低酸素誘導的な制御システム下で *Epo* のかわりに *GFP* を発現する (図 1a)。そこで私は、ISAM の慢性貧血低酸素が *GFP* 発現を増強することで、*Epo* 産生細胞を効率的に観察することが可能になると予想した。実際に、ISAM における *GFP* mRNA の発現レベルは、*GFP* ノックインアリルをヘテロ接合体に持つ *Epo*^{+/-}マウスよりも著明に誘導された (図 11a)。*GFP* mRNA の発現レベルは、腎臓で最も高く、肝臓で 2 番目に高く、脳においても検出された。この発現プロファイルは、貧血状態のマウスにおける内在性の *Epo* 遺伝子の発現と相関した¹⁴。*GFP* mRNA 発現の貧血誘導性は、rHuEPO により貧血が回復したときの ISAM において、発現レベルが顕著に低下することにより確認

された (図 11b)。

ISAM の腎臓と肝臓における GFP 発現は蛍光顕微鏡により観察でき (図 11c)、多数の GFP を発現する Epo 産生細胞が同定された (図 11d)。特に、ISAM の腎臓では、皮質と髄質外層の間質領域に GFP 標識された REP 細胞 (腎臓 Epo 産生細胞) が広く分布した。一方で、通常または急性貧血状態の *Epo*^{+/-}マウスの腎臓では、GFP 陽性の REP 細胞は皮質深部に限局して分布した。ISAM 腎臓の GFP 陽性細胞は、傍尿細管の間質部位に位置し、REP 細胞^{6, 15, 16} および腎線維芽細胞^{22, 42} の細胞表面マーカーである CD73 と PDGFR β を発現した (図 12a)。また、FACS により ISAM の腎臓細胞懸濁液から、REP 細胞を GFP 陽性画分として回収することに成功した (図 12b)。これらの結果から、ISAM は外部からの刺激を必要とせずに、GFP 発現による REP 細胞の効率的な観察を可能にした。

9. *Epo-Cre* と ISAM の組合せによる REP 細胞標識の劇的な効率化

さらに *Cre-loxP* 標識システム⁴³ による REP 細胞の永久標識を行うことで、腎内の Epo 産生能を持つ全ての細胞の同定を試みた。Epo 産生細胞において Cre 組換え酵素を発現させるため、*Epo* 遺伝子制御を個体レベルで再現することができる制御領域として、マウス *Epo* 遺伝子周辺 180-kb を含む BAC (大腸菌人工染色体)¹⁴ を用いた

(図 13a、*Epo-Cre*)。3 系統の *Epo-Cre* トランスジェニックマウスを作成し (44、47 および 48 系統)、Cre 組換えのレポーターマウス (*Rosa26-STOP-tdTomato*、以下 *R26T* と省略する)³⁰ と交配を行った。このマウス系統では、*Cre-loxP* による組換えを一度起こした細胞は、強力な *tdTomato* (赤色蛍光タンパク質) 発現により持続的に蛍光標識される (図 13a)。

Epo-Cre:R26T マウスの *tdTomato* 蛍光は、主に肝臓と脳で検出され、系統間で異なる組換え効率を示した (図 13b)。成体の肝臓と脳における通常時の *Epo* 発現レベルは低いことから、これらの臓器における *tdTomato* 発現は、胎生期の肝実質細胞や神経系細胞における *Epo* 発現 (N.S. *et al*, in submission) と組換えを、追跡により反映したものであると考えられた。*Epo-Cre:R26T* マウスの腎臓では、皮髄境界を中心とした尿細管間質部位に *tdTomato* 陽性細胞が観察され、急性貧血状態において *tdTomato* 発現細胞の数は増加した (図 14a)。*tdTomato* 陽性細胞は、線維芽細胞様の形態と *CD73* 発現を示すことから、*REP* 細胞と実質的に同一であると考えられた (図 14b)。

ISAM の慢性重度貧血により *Epo-Cre* の組換えを誘導したところ、腎臓、肝臓および脳において *tdTomato* 発現が増強した (図 15a)。驚くべきことに、腎臓の *tdTomato* 陽性細胞数は劇的に増加し、皮質と髄質外層の間質全体に広がって分布した (図 15b)。また、*GFP* 標識細胞よりも *tdTomato* 標識される細胞の方が多く (図 15c)、多数の *REP*

細胞において交互に *Epo-Cre* の組換えが誘導されたことを示唆する結果であった。

ISAM の貧血は、腎臓の発生が完了する生後 2 週以降に進行するため、2 週齢の時点における *Epo-Cre* の組換え効率は、ISAM とコントロールの遺伝的背景で同程度であった (図 15d)。この結果は、成体腎臓の終末分化した線維芽細胞が、重度の貧血低酸素に応答し、自身の Epo 産生能を用いて *Epo-Cre* トランスジーンを発現を活性化したことを示している。以上の結果により、潜在的 Epo 産生細胞は、腎内の皮質と髄質外層の間質領域に傍尿細管の線維芽細胞として幅広く存在することを明らかにした。

10. 一側尿管結紮モデルの腎線維化における REP 細胞の追跡

腎線維化における REP 細胞の寄与を検討するため、*Epo-Cre:R26T* を用いた追跡実験を行った。*Epo-Cre:R26T* マウスに急性貧血を誘導した後、UUO (一側尿管結紮)を行った。5 日後の腎臓を解析したところ、UUO 側の皮質において、対側 (No-UUO) に比べて多数の tdTomato 陽性細胞を認めた (図 16a)。このとき、UUO 側におけるほぼ全ての tdTomato 陽性細胞は、筋線維芽細胞のマーカーである α SMA を発現していた (図 16b)。また、14 日後の UUO 側腎臓においても、tdTomato 陽性細胞は皮髄境界部に存在し、 α SMA を発現した (図 17)。これらの結果から、REP 細胞が筋線維芽細胞への形質転換により細胞増殖を起こし、線維化に貢献したことが示唆された。

さらに、大多数の REP 細胞を標識できる ISAM:*Epo-Cre*:*R26T* 複合マウスを用いて、腎線維化に対する REP 細胞の貢献度を検討した。その結果、UUO 14 日後の腎臓の皮質全体において、tdTomato 陽性の REP 細胞に由来する細胞集団によって線維化が形成されることが明らかとなった。また、この線維化を形成する tdTomato 陽性細胞は、GFP 発現能をほぼ消失した。これらの結果から、腎臓の線維化において REP 細胞は消失せずに残存するが、形質変化に伴い Epo 産生能を失い、筋線維芽細胞として皮質の線維化形成に大きく貢献することを明らかにした。

6. 考察

本研究では、私達のグループによる *Epo* 遺伝子制御領域に関する最新の成果を活用することで、新規の成体 *Epo* 欠損貧血モデルマウス (ISAM) を樹立することに成功した。本マウス系統は、成体期における *Epo* の産生制御と造血機能を解析するための優れた実験系をもたらした。今回、ISAM の骨髄において、rHuEPO 投与に反応して誘導される下流の標的遺伝子群を同定した。さらに、ISAM は REP 細胞の標識の効率を劇的に改善し、腎内における潜在的 *Epo* 産生細胞の存在範囲を明らかにした。

当研究室の成果を含めた先行研究から、*Epo* 遺伝子の近傍領域において 2 つの重要な制御エレメントが明らかにされている。プロモーター内の抑制にはたらく GATA 配列と¹⁴、遺伝子下流の肝臓特異的エンハンサー *EpoE-3'* である^{5,9}。今回の研究では、両エレメントを含む 8-kb の遺伝子近傍領域を、*3.3-Epo3'* トランスジーンとして *Epo* 遺伝子欠失マウスに導入した。その結果、*Epo* 遺伝子近傍領域の持つ制御活性は、肝臓の発現を誘導するには十分であるが、異所性発現の抑制には不十分であることが明確に示された。また、*3.3-Epo3'* トランスジーンは腎臓の発現を再現できないことから、適切な *Epo* 遺伝子制御における遠位の制御領域の必要性が示された^{12,13}。

出生後に主要 *Epo* 産生臓器は肝臓から腎臓へと切り替わるため、レスキューマウスは成体において *Epo* 欠損貧血を発症することが予想された。恒常的なトランスジーン

ン発現により多くのレスキューマウスが多血症を呈したものの、1 系統でのみトランスジーンの異所性発現が低レベルに抑えられたことにより、Hct 20%以下の重度 Epo 欠損貧血を発症することを見出した。このような成体における ISAM 系統のトランスジーン発現が低く抑えられた原因については、いくつかの説明が考えられた。一つには、トランスジーンの挿入された染色体の位置効果が大きく作用し、トランスジェニック系統間でのトランスジーン発現パターンの多様性に寄与している可能性である。私は、ISAM 系統のトランスジーン挿入部位を検討し、4 番染色体の *Smu1* 遺伝子座周辺であることを明らかにしているが、*Smu1* 遺伝子の発現パターンとトランスジーン発現との相関について明らかな関係性はなく、位置効果だけで説明できるかは不明である。二つ目の説明として、トランスジーンに含まれる異所性発現に対する抑制活性が ISAM 系統では強く作用し、他の系統では位置効果による異所性発現に対して抑制が十分にはたらかなかった可能性が考えられる。本研究に用いたトランスジーンには、上皮細胞において抑制にはたらくプロモーター上の GATA 配列が含まれるが、他の抑制活性を含むエレメントの存在も考えられ、今後の課題として挙げられる。

成体における Epo 欠損のモデルマウスについて、複数のグループから報告がされている。条件付き *Epo* 遺伝子破壊マウスは、成体期において誘導的な遺伝子欠失の後に、血清 Epo を維持し、中程度の貧血を示した²⁷。*Hif-2 α* 遺伝子の全身欠失あるいは

条件付き欠失は、Epo 産生の低下による貧血を引き起こす^{28, 44, 45}。これにより、*Epo* 遺伝子制御における HIF-2 α の必要性が明らかにされたが、貧血に *Epo* 以外の HIF 標的遺伝子の影響が関与している可能性は否定できなかった。マウス *Epo* 遺伝子プロモーター領域に、SV40 T 抗原 (TA α) トランスジーンが相同組換えにより挿入されることで、低形質 *Epo* アリル (Epo-TA α^H) が作成されている¹⁵。ホモ接合体の Epo-TA α^H マウスは、ISAM と同様の重度の貧血を呈し、Epo 欠損動物モデルとして広く利用されている^{33, 46, 47}。一方で、Epo-TA α の融合遺伝子産物の影響により、Epo に対する自己抗体の産生や、腫瘍形成といった問題が Epo-TA α^H マウスには伴った^{48, 49}。これらの以前のモデルに対して、ISAM は誘導を必要とせずに遺伝学的に成体発症型の貧血を再現し、その表現型は Epo 欠損にのみ依存したものであると考えられた。また、ISAM は正球性正色素性貧血や腎臓 Epo 発現の低下などの、腎性貧血の典型的な特徴を示した。

ISAM の骨髄において早期の赤芽球が顕著に障害されており、この段階が Epo シグナルの主な標的であることが示された^{5, 38, 50}。一方、最近の研究から Epo の神経保護／心機能保護／血管新生／抗炎症作用などの多面的機能が示されているが^{20, 23, 51}、ISAM において造血外機能を示す結果は現在までに観察されていない。これは Epo が主として赤血球成長因子であることを強調する結果であるが⁵²、造血外組織における

Epo の作用を検証するためには詳細な解析をするべきである。

組換え EPO 製剤 (rHuEPO) は、様々な種類の貧血の患者に対して有効な薬として広く使用されている^{20,23,24}。しかし、その下流ではたらく標的遺伝子について十分に理解されていない。以前の研究では、主に赤血球前駆細胞の初代培養を用いて、Epo 刺激に対する網羅的な遺伝子発現変化の解析が行われてきた^{39,40}。今回の実験では、ISAM の Epo 欠損状態を利用して個体レベルのマイクロアレイ解析を行い、骨髓において Epo 投与により 6 時間という早い段階で誘導される遺伝子群を同定した。その結果、既知の標的遺伝子に加えて、collagenase-3 をコードする *Mmp13* 遺伝子が Epo シグナルの下流標的遺伝子であることを見出した。この酵素は、骨芽細胞や軟骨細胞で産生され、骨の再構築にはたらく⁵³。今回の結果は、造血亢進に伴う骨空間を Epo が直接あるいは間接的に調節している可能性を示しており、以前に Epo が造血と共役して骨代謝や骨髓微小環境を制御するという報告と一致する^{39,41}。また、今回の結果では、*Mmp13*、*Igfbp2* および *Pklr* 遺伝子が骨髓特異的に Epo により誘導されることを明らかにした。このような Epo-EpoR シグナルの組織特異的役割について、ISAM を用いたさらなる解析により解明できると考えられた。

REP 細胞は腎内の低酸素環境シグナルを感知して、*Epo* 遺伝子の発現を on-off に制御する^{14,18}。私達のグループによる GFP レポーターマウス解析は、REP 細胞を

線維芽細胞様の傍尿細管細胞として同定し、単離することを可能にした^{6, 14, 17}。しかしながら、低酸素誘導的な Epo 産生という特性により、重度の貧血あるいは低酸素刺激下においてであっても、同定できる REP 細胞の数には限りがあった^{14, 18, 19}。今回の研究では、ISAM の慢性重度貧血により増強された GFP 発現が、外部刺激を必要とせず、遺伝学的に再現性の高い条件下での、REP 細胞標識の効率化を実現した。また、ISAM と *Epo-Cre:R26T* マウスの *Cre-loxP* システムを組合せることにより、*Epo* 遺伝子座を一度でも活性化した細胞を tdTomato 蛍光により永久標識できるため、REP 細胞の標識効率はさらに向上した。これまでの研究から、腎内の Epo 産生は、尿細管間質の特殊な細胞集団に限定されと考えられてきた^{18, 54}。私は、REP 細胞と腎間質線維芽細胞が同じ系列の細胞から分化するという以前の知見²²と今回の結果を基にして、潜在的に Epo を産生する能力は皮質と髄質外層の間質線維芽細胞全体に生来備わっていることを提案したい。すなわち、ある貧血／低酸素状態において、ごく一部の REP 細胞（ON-REP）が Epo の供給源としてはたらくが、残りの大部分の REP 細胞（OFF-REP）は Epo を産生しない休止状態にある。この 2 つの細胞状況における差異を明らかにすることは、REP 細胞の持つ低酸素応答能の分子機構に関して重要な知見をもたらすと考えられる。

一方で、本研究で明らかにした潜在的な Epo 産生能が、皮質と髄質外層の線維芽

細胞において一様に同じレベルの *Epo* 発現活性を持つことを示すのかは不明である。

線維芽細胞全体では低レベルの産生能を持つものの、生理的条件下における *Epo* 産生は、より強い産生能を持つ一部の細胞によって主に供給される可能性は否定できない。

先行研究においては、腎内 *Epo* mRNA 発現量と *Epo* 発現細胞数はともに Hct 低下や酸素濃度低下に従い指数関数的に増加することから、*Epo* 産生細胞は個々の発現量がほぼ一定レベルに on-off 制御されるモデルが提唱されている。また、GFP レポーターマウスを用いた REP 細胞の解析からは、GFP 低発現の細胞は少なく GFP 高発現の細胞が多数であることから、今回明らかにした潜在的 *Epo* 産生能は一様に生理的に意義のある *Epo* 産生能としてはたらくものであると考えている。また、本研究では少数ながら髄質内層の間質領域においても GFP あるいは tdTomato 標識された REP 細胞が観察されており、髄質内層の間質線維芽細胞全体が *Epo* 産生能を有するのかについても興味深い。腎皮質および髄質の間質細胞は共通の起源を持つことから考えると、髄質内層は低酸素環境になりにくい部位であるのか、あるいは抑制する分子機構を獲得したのかについて、今後検証する余地が残る。

さらに、REP 細胞の *Epo* 分泌以外の機能として、腎臓の線維化への寄与についての研究を進めた。私達のグループは、ISAM を用いた解析から、腎臓障害時に REP 細胞が筋線維芽細胞へ形質変化することを明らかにしている (Souma, T. *et al*, in

submission)。腎線維化を担う筋線維芽細胞の由来については、*Cre-loxP* システムによる運命追跡実験が複数のグループで行われ、腎内の間質線維芽細胞や周皮細胞（血管周囲線維芽細胞）が主であると報告されている⁵⁵。一方で、腎線維化時の筋線維芽細胞の起源として、骨髄中の線維細胞（fibrocyte）の遊走や、近位尿細管の上皮間葉移行（epithelial-mesencymal transition, EMT）、あるいは血管内皮の内皮間葉移行（endothelial-mesencymal transition, EndoMT）が関与すると主張する報告も多く、議論が続いている²¹。本研究では UUO モデルを用いた実験結果から、少なくとも皮質においては REP 細胞、すなわち Epo 産生能を持つ間質線維芽細胞が筋線維芽細胞の主な供給源であることを明らかにした。また、この形質転換時に Epo 産生能を消失することが、腎線維化により腎性貧血が引き起こされる主な原因であることを示した。今後は、他の腎障害モデルを用いた場合の線維化においても、筋線維芽細胞の増殖が REP 細胞に大きく由来することを検証する必要があると考えられる。また、この REP 細胞の形質転換がどのような分子機構で制御されているのか、あるいはヒストン修飾や DNA メチル化などのエピゲノム変化が Epo 産生能消失に関与するのかについて、今後の課題として挙げられる。本研究で樹立したマウスを用いることで、正常な REP 細胞と筋線維芽細胞へと形質変化した細胞を FACS により単離することが可能であり、有用な実験ツールとなると期待される。さらに、ISAM を用いた腎障害モデルの実験

は、Epo 産生能消失という現象を GFP 発現低下という指標で解析することが可能である。レニン・アンジオテンシン系阻害剤などに代表される腎臓で用いられる製剤が、線維化の抑制や REP 細胞の形質変化の過程に与える影響について今後検証できるのではないかと考えられる。

以上より、ISAM が成体における Epo 欠損貧血の様々な側面を忠実に再現することを示した。このマウスの表現型を詳しく解析することで、腎性貧血でみられるような尿毒素や炎症性サイトカインなどの二次的影響がない条件で、Epo 欠損が成体造血や貧血の合併症に及ぼす影響について新しい知見が得られるであろう。また、ISAM は ESA（赤血球造血刺激因子製剤）を評価する動物モデルとしても役立つと考えられる。最後に、今回樹立した REP 細胞のモニターシステムにより、生理的および病的状態における REP 細胞の解析が可能となる。

7. 結論

1. *Epo* 遺伝子欠失マウスのトランスジェニック相補レスキューにより、腎臓 *Epo* 産生能を失い重度 *Epo* 欠損貧血を呈するマウス系統 (ISAM) を樹立した。
2. *Epo* 遺伝子制御領域を含む BAC に *Cre* cDNA を導入することで、*Epo* 産生細胞特異的に *Cre* 組換え酵素を発現する *Epo-Cre* トランスジェニックマウスを樹立した。
3. ISAM および *Epo-Cre* マウスを用いることで、*Epo* 産生細胞を効率に標識することができ、特に腎皮質および髄質外層に存在する間質線維芽細胞のほぼ全てに潜在的な *Epo* 産生能が備わることを明らかにした。
4. 腎線維化は *Epo* 産生細胞の筋線維芽細胞への形質転換により形成され、このとき *Epo* 産生能を消失することが腎性貧血を発症する原因であることを明らかにした。
5. ISAM の *Epo* 欠損状態を利用し、個体レベルでの骨髄における *Epo* 応答性遺伝子群を明らかにした。

8. 参考文献

1. Koury, M.J. Erythropoietin: the story of hypoxia and a finely regulated hematopoietic hormone. *Exp Hematol* **33**, 1263-1270 (2005).
2. Richmond, T.D., Chohan, M. & Barber, D.L. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* **15**, 146-155 (2005).
3. Zanjani, E.D., Ascensao, J.L., McGlave, P.B., Banisadre, M. & Ash, R.C. Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest* **67**, 1183-1188 (1981).
4. Dame, C. *et al.* Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood* **92**, 3218-3225 (1998).
5. Suzuki, N. *et al.* Specific contribution of the erythropoietin gene 3' enhancer to hepatic erythropoiesis after late embryonic stages. *Mol Cell Biol* **31**, 3896-3905 (2011).
6. Pan, X. *et al.* Isolation and characterization of renal erythropoietin-producing cells from genetically produced anemia mice. *PLoS One* **6**, e25839 (2011).
7. Fandrey, J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R977-988 (2004).
8. Ebert, B.L. & Bunn, H.F. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* **94**, 1864-1877 (1999).
9. Semenza, G.L., Dureza, R.C., Traystman, M.D., Gearhart, J.D. &

- Antonarakis, S.E. Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements. *Mol Cell Biol* **10**, 930-938 (1990).
10. Semenza, G.L. & Wang, G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447-5454 (1992).
 11. Rankin, E.B. *et al.* Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest* **117**, 1068-1077 (2007).
 12. Madan, A., Lin, C., Hatch, S.L. & Curtin, P.T. Regulated basal, inducible, and tissue-specific human erythropoietin gene expression in transgenic mice requires multiple cis DNA sequences. *Blood* **85**, 2735-2741 (1995).
 13. Semenza, G.L., Koury, S.T., Neufelt, M.K., Gearhart, J.D. & Antonarakis, S.E. Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8725-8729 (1991).
 14. Obara, N. *et al.* Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* **111**, 5223-5232 (2008).
 15. Maxwell, P.H. *et al.* Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* **44**, 1149-1162 (1993).
 16. Bachmann, S., Le Hir, M. & Eckardt, K.U. Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem*

- Cytochem* **41**, 335-341 (1993).
17. Suzuki, N., Obara, N. & Yamamoto, M. Use of gene-manipulated mice in the study of erythropoietin gene expression. *Methods Enzymol* **435**, 157-177 (2007).
 18. Koury, S.T., Koury, M.J., Bondurant, M.C., Caro, J. & Graber, S.E. Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood* **74**, 645-651 (1989).
 19. Eckardt, K.U. *et al.* Distribution of erythropoietin producing cells in rat kidneys during hypoxic hypoxia. *Kidney Int* **43**, 815-823 (1993).
 20. Jelkmann, W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* **78**, 183-205 (2007).
 21. Quaggin, S.E. & Kapus, A. Scar wars: mapping the fate of epithelial-mesenchymal-myofibroblast transition. *Kidney Int* **80**, 41-50 (2011).
 22. Asada, N. *et al.* Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest* **121**, 3981-3990 (2011).
 23. Fisher, J.W. Landmark advances in the development of erythropoietin. *Exp Biol Med (Maywood)* **235**, 1398-1411 (2010).
 24. Elliott, S. Erythropoiesis-stimulating agents. *Cancer Treat Res* **157**, 55-74 (2011).
 25. Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. & Lodish, H.F. Generation of committed

- erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* **83**, 59-67 (1995).
26. Lin, C.S., Lim, S.K., D'Agati, V. & Costantini, F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* **10**, 154-164 (1996).
 27. Zeigler, B.M., Vajdos, J., Qin, W., Loverro, L. & Niss, K. A mouse model for an erythropoietin-deficiency anemia. *Dis Model Mech* **3**, 763-772 (2010).
 28. Gruber, M. *et al.* Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2301-2306 (2007).
 29. Brandt, W. *et al.* Defining the functional boundaries of the Gata2 locus by rescue with a linked bacterial artificial chromosome transgene. *J Biol Chem* **283**, 8976-8983 (2008).
 30. Madisen, L. *et al.* A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* **13**, 133-140 (2010).
 31. Golde, W.T., Gollobin, P. & Rodriguez, L.L. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)* **34**, 39-43 (2005).
 32. Dame, C., Juul, S.E. & Christensen, R.D. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* **79**, 228-235 (2001).
 33. Binley, K. *et al.* Long-term reversal of chronic anemia using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy. *Blood* **100**, 2406-2413

- (2002).
34. Suzuki, M. *et al.* Real-time monitoring of stress erythropoiesis in vivo using Gata1 and beta-globin LCR luciferase transgenic mice. *Blood* **108**, 726-733 (2006).
 35. Ou, L.C., Kim, D., Layton, W.M. & Smith, R.P. Splenic erythropoiesis in polycythemic response of the rat to high-altitude exposure. *J Appl Physiol* **48**, 857-861 (1980).
 36. Socolovsky, M. *et al.* Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* **98**, 3261-3273 (2001).
 37. Suzuki, N. *et al.* Identification and characterization of 2 types of erythroid progenitors that express GATA-1 at distinct levels. *Blood* **102**, 3575-3583 (2003).
 38. Du Roure, C. *et al.* Correction of severe anaemia using immuno-regulated gene therapy is achieved by restoring the early erythroblast compartment. *Br J Haematol* **132**, 608-614 (2006).
 39. Sathyanarayana, P. *et al.* Erythropoietin modulation of podocalyxin and a proposed erythroblast niche. *Blood* **110**, 509-518 (2007).
 40. Sivertsen, E.A. *et al.* PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. *Br J Haematol* **135**, 117-128 (2006).
 41. Singbrant, S. *et al.* Erythropoietin couples erythropoiesis, B-lymphopoiesis, and bone homeostasis within the bone marrow microenvironment. *Blood* **117**, 5631-5642 (2011).

42. Kaissling, B., Hegyi, I., Loffing, J. & Le Hir, M. Morphology of interstitial cells in the healthy kidney. *Anat Embryol (Berl)* **193**, 303-318 (1996).
43. Duffield, J.S. & Humphreys, B.D. Origin of new cells in the adult kidney: results from genetic labeling techniques. *Kidney Int* **79**, 494-501 (2011).
44. Kapitsinou, P.P. *et al.* Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood* **116**, 3039-3048 (2010).
45. Scortegagna, M. *et al.* HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood* **105**, 3133-3140 (2005).
46. El Hasnaoui-Saadani, R. *et al.* Cerebral adaptations to chronic anemia in a model of erythropoietin-deficient mice exposed to hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**, R801-811 (2009).
47. Raja, K.B. *et al.* Iron metabolism in transgenic mice with hypoplastic anaemia due to incomplete deficiency of erythropoietin. *Br J Haematol* **96**, 248-253 (1997).
48. Maxwell, P.H. *et al.* Sites of erythropoietin production. *Kidney Int* **51**, 393-401 (1997).
49. Rinsch, C. *et al.* Delivery of erythropoietin by encapsulated myoblasts in a genetic model of severe anemia. *Kidney Int* **62**, 1395-1401 (2002).
50. Liu, Y. *et al.* Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* **108**, 123-133 (2006).
51. Alnaeeli, M. *et al.* Erythropoietin in brain development and beyond. *Anat*

Res Int **2012**, 953264 (2012).

52. Suzuki, N. *et al.* Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood* **100**, 2279-2288 (2002).
53. Stickens, D. *et al.* Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* **131**, 5883-5895 (2004).
54. Paliege, A. *et al.* Hypoxia-inducible factor-2alpha-expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization. *Kidney Int* **77**, 312-318 (2010).
55. Wynn TA and Ramalingam TR. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature Reviews Nephrology* **7**, 684-696 (2011).

9. 図

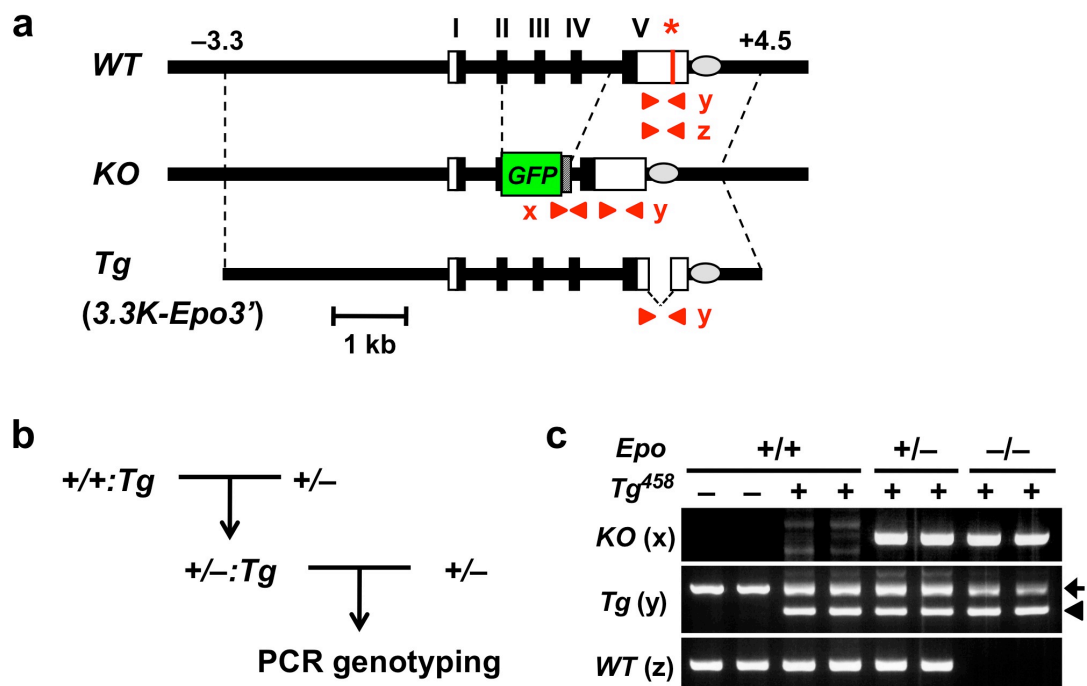


図 1. 3.3K-Epo3'により Epo KO マウスの胎生致死が回避される

(a) *Epo* 遺伝子の野生型 (WT) およびノックアウト (KO) アリルと 3.3K-Epo3'トランスジェン (Tg) の構造。KO アリルは、*Epo* 遺伝子の第 II-IV エクソンが GFP cDNA に置換されている。Tg は転写開始点上流 3.3-kb (-3.3) から下流 4.5-kb (+4.5) までの領域で構成され、肝臓特異的エンハンサーEpoE-3' (灰色円) を含み、第 V エクソンの 0.3-kb の領域を欠失している。白四角は非翻訳領域、黒四角は翻訳領域を示す。

(b) トランスジェニックレスキュー実験の交配方法。樹立した 11 系統の Tg マウスを、*Epo*^{+/-} マウスと繰り返し交配し、*Epo*^{+/-};Tg マウスと *Epo*^{+/-} マウスの交配から得られた産仔の遺伝子型を PCR により解析した。

(c) PCR 遺伝子型決定の代表的データ。458 系統のレスキュー実験から得られた産仔の尾の DNA を用いて、a に示したプライマーセット (x, y, z) により検出した。Tg はプライマーセット y により短い PCR 産物で検出され (矢頭)、WT と KO アリルは長い PCR 産物で検出される (矢印)。WT アリル (C57BL/6 由来) を KO アリル及び Tg (両方とも 129/Sv ゲノム由来) と区別するために、C57BL/6 特異的な配列 (a に*で示した) をプライマーセット z により検出した。

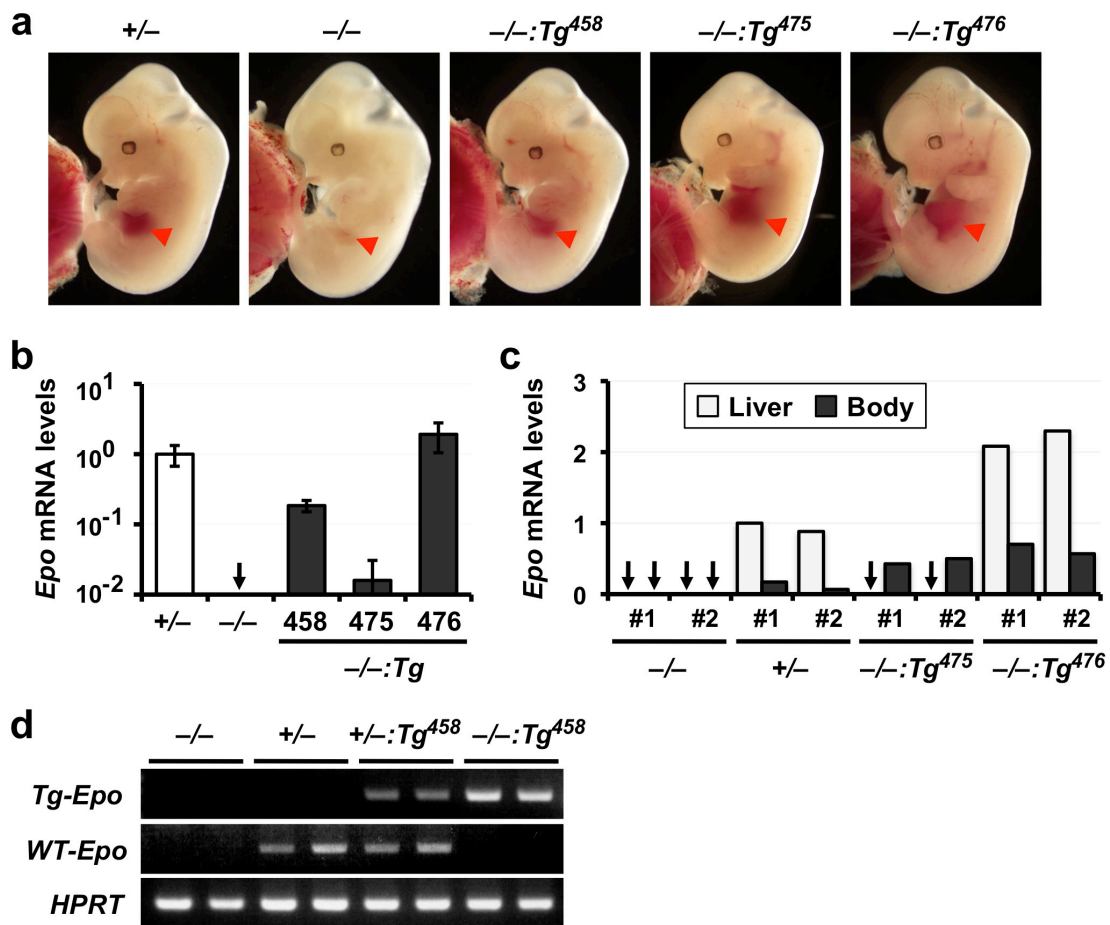


図 2. *Tg* により胎仔肝臓における *Epo* mRNA 発現が回復する

(a) 胎生 12.5 日の胎仔。 *Epo*^{-/-}胎仔は肝臓（矢頭）が白く、重度の貧血を示した。レスキュー胎仔（458、475 および 476 系統）は *Epo*^{+/+}胎仔の肝臓と同様の赤い肝臓を持つ。(b) 胎生 12.5 日の肝臓における *Epo* mRNA 発現レベル。レスキュー胎仔（458、475 および 476 系統）の肝臓において *Epo* mRNA が発現するが、*Epo*^{-/-}胎仔の肝臓では検出できない（矢印は検出限界以下のレベル）。発現レベルは同腹の *Epo*^{+/+}胎仔の肝臓を 1 としたときの相対値で表した ($n = 3-7$)。 (c) 胎生 12.5 日の肝臓と他の身体部位における *Epo* mRNA 発現レベル。発現レベルは *Epo*^{+/+}胎仔（#1）の肝臓を 1 としたときの相対値で表した。 (d) *Tg* 由来と内在性の *Epo* mRNA を特異的なプライマーを用いた半定量 RT-PCR 解析により区別して検出した。458 系統の胎生 12.5 日における同腹仔の肝臓を解析に用いた。内部標準に *HPRT* mRNA を用いた。

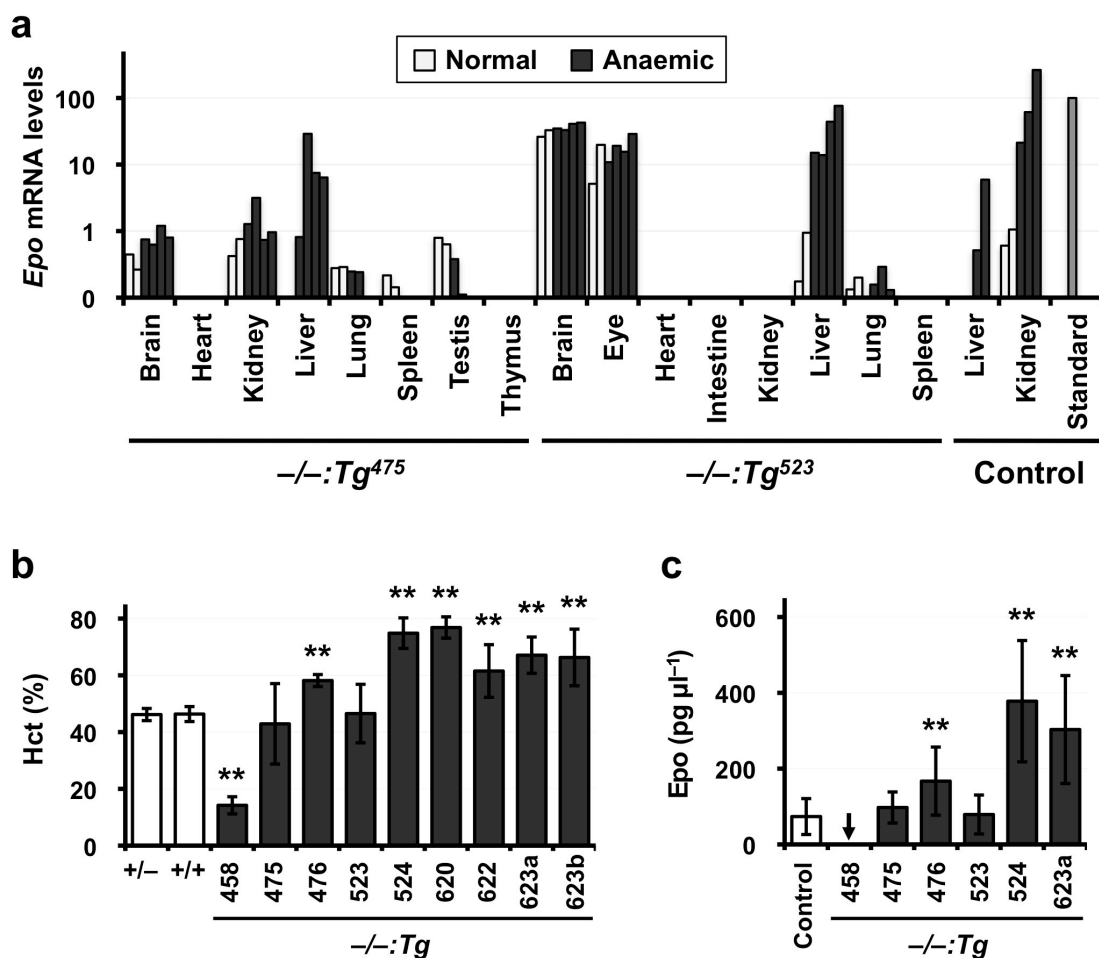


図 3. 恒常的 Tg 発現により 6 系統のレスキューマウスが多血症を示す

(a) 8 から 18 週齢のレスキューマウス (475 および 523 系統) とコントロールマウス ($Epo^{+/+}$ および $Epo^{+/-}$) の通常 ($n=2$) または急性貧血 ($n=2-4$) 状態における各臓器の Epo mRNA 発現レベル。結果は標準サンプル (貧血の $Epo^{+/-}$ マウス腎臓) の発現レベルを 100 (灰色バー) としたときの相対値で表した。 (b) 8 から 14 週齢のレスキューマウスとコントロールマウス ($Epo^{+/+}$ または $Epo^{+/-}$) のヘマトクリット (Hct)。** $P < 0.005$ vs $Epo^{+/+}$ mice ($n=4-37$)。 (c) 8 から 29 週齢のレスキューマウスとコントロールマウス ($Epo^{+/+}$ および $Epo^{+/-}$) の血漿中の Epo 濃度を ELISA により測定した。** $P < 0.005$ vs Control ($n=6-22$)。矢印は検出限界以下のレベル。

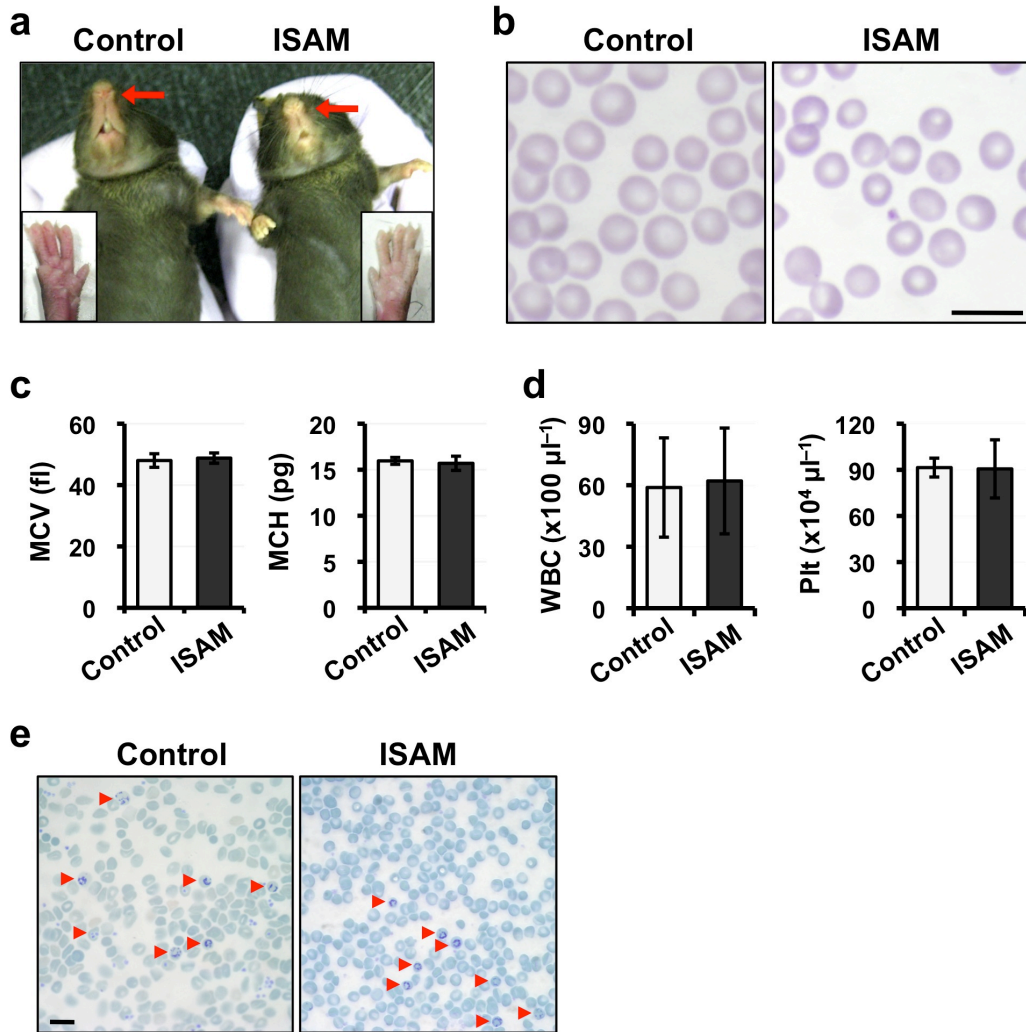


図 4. ISAM は低増殖性の正球性正色素性貧血を示す。

(a) ISAM ($Epo^{-/-};Tg^{458}$ マウス) の 鼻 (矢印) と足 (inlet) は $Epo^{+/-}$ マウス (Control) に比べて白い。 (b) ISAM と $Epo^{+/-}$ マウス (Control) の末梢血スメアのライトギムザ染色。スケールバーは 20 μm 。 (c) 8 週齢の ISAM と $Epo^{+/-}$ マウス (Control) の平均赤血球容量 (MCV) と平均赤血球色素量 (MCH)。Control ($n = 13$)、ISAM ($n = 26$)。 (d) 12 から 14 週齢の ISAM と $Epo^{+/-}$ マウス (Control) の白血球数と血小板数。Control ($n = 16$)、ISAM ($n = 12$)。 (e) ISAM と野生型マウス (Control) の末梢血スメアのニューメチレンブルー染色。矢頭は網状赤血球。スケールバーは 100 μm 。

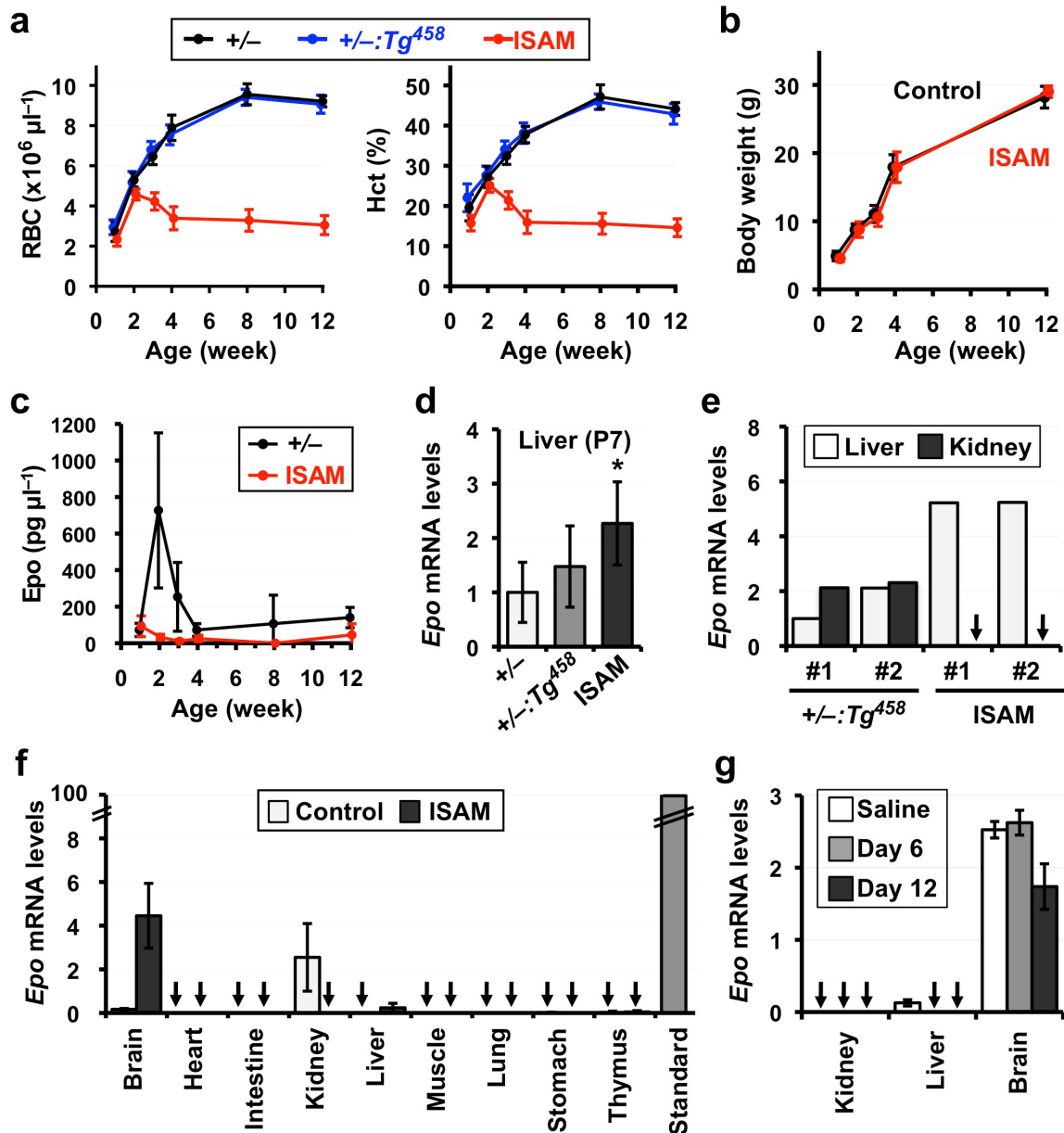


図 5. ISAM は腎臓 Epo 発現の消失により成体発症型の Epo 欠損貧血を示す (a-c) 1 から 12 週齢までの ISAM と同腹コントロールマウス ($Epo^{+/-}$ および $Epo^{+/-}:Tg^{458}$) の赤血球数 (RBC)、Hct、体重および血漿 Epo 濃度の変化 ($n = 7-21$ (a,c), $n = 3-26$ (b)). (d,e) 出生後 7 日における ISAM と同腹コントロールマウス ($Epo^{+/-}$ または $Epo^{+/-}:Tg^{458}$) の肝臓と腎臓の Epo mRNA 発現レベル。* $P < 0.05$ vs $Epo^{+/-}$ マウス ($n = 4-6$ (d)). (f) 12 週齢の ISAM と $Epo^{+/-}$ マウス (Control) の各臓器における Epo mRNA 発現レベル。結果は標準サンプル (貧血の $Epo^{+/-}$ マウス腎臓) の発現レベルを 100 (灰色バー) としたときの相対値で表した ($n = 3$)。矢印は検出限界以下の発現レベル。(g) 12 週齢の ISAM を rHuEPO 投与により貧血から回復させたときの腎臓、肝臓および脳における Epo mRNA 発現レベル ($n = 4$)。生理食塩水投与 12 日後の ISAM をコントロールに用いた (Saline)。このときの Hct は図 9b に示した。

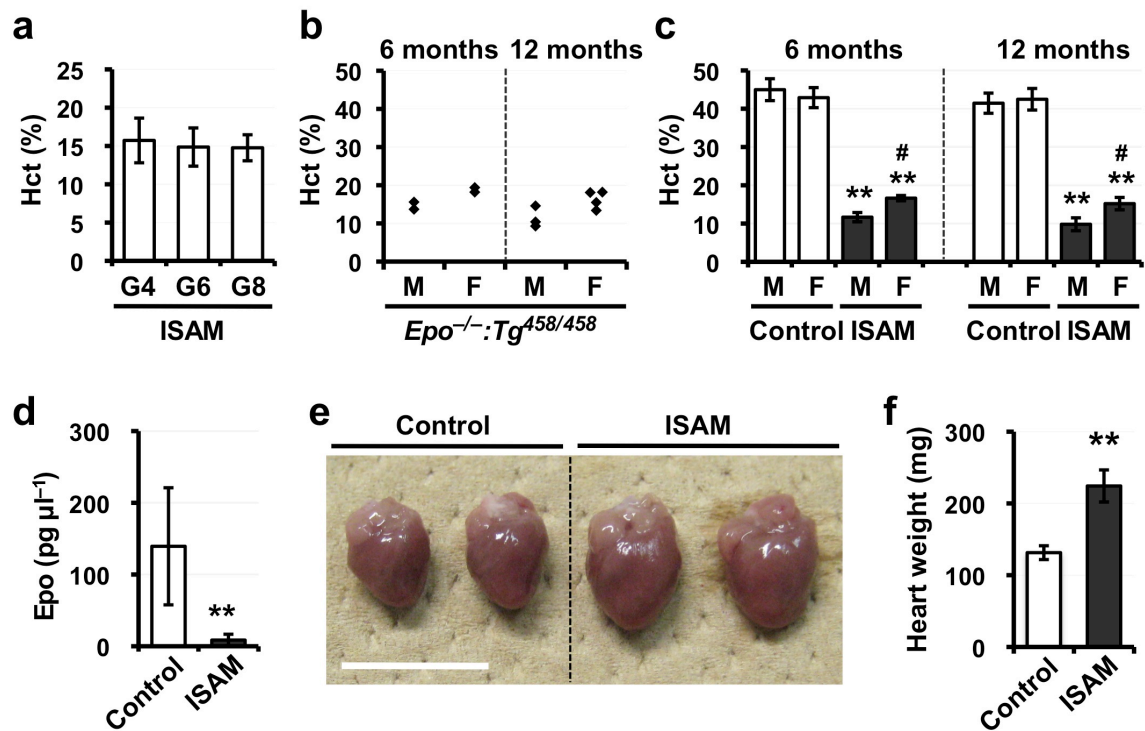


図 6. ISAM の遺伝学的に再現される重度 Epo 欠損貧血

(a) 初代トランスジェニックマウスから 4、6 および 8 世代目 (G4、G6 および G8) における 8 から 14 週齢の ISAM の Hct ($n=6-11$)。 (b) Tg をホモ接合体に持つ ISAM ($Epo^{-/-};Tg^{458/458}$) の 6 ヶ月齢と 12 ヶ月齢における雄 (M) と雌 (F) の Hct ($n=2-4$)。 (c) 6 ヶ月齢と 12 ヶ月齢の ISAM とコントロールマウス ($Epo^{+/-}$ および $Epo^{+/-};Tg^{458}$) の Hct。 ISAM の Hct は雄 (M) よりも雌 (F) の方が高い ($\#P<0.05$)。 $**P<0.005$ vs Control (月齢と性別を合わせた、 $n=5-23$)。 (d) 12 ヶ月齢の ISAM と $Epo^{+/-}$ マウス (Control) の血漿中の Epo 濃度。 $**P<0.005$ vs Control (ISAM $n=21$ 、Control $n=6$)。 (e,f) 12 週齢の雄の ISAM とコントロールマウス ($Epo^{+/-}$ および $Epo^{+/-};Tg^{458}$) の心臓の写真(e)と重量(f)。スケールバーは 1 cm。 $**P<0.005$ vs Control ($n=3-5$)。

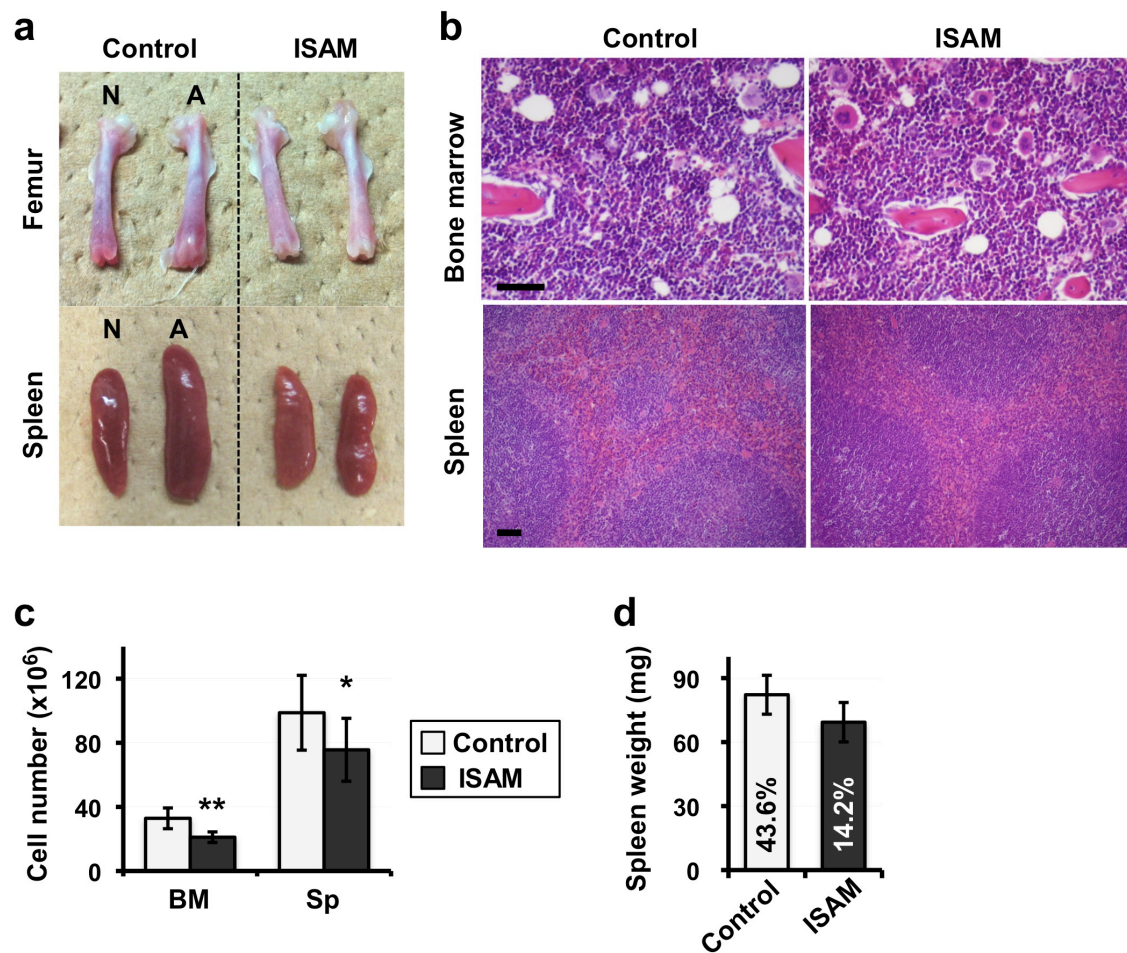


図 7. ISAM の骨髄と脾臓における血球細胞数が減少する

(a) 12 週齢の ISAM と通常 (N) または急性貧血 (A) 状態におけるコントロールマウス ($Epo^{+/-}$ および $Epo^{+/-};Tg^{458}$) の大腿骨と脾臓のマクロ所見。 (b) ISAM とコントロールマウスの骨髄と脾臓の組織切片のヘマトキシリンエオジン染色。スケールバーは 100 μ m。 (c) 8 から 12 週齢の ISAM とコントロールマウスの骨髄 (BM) と脾臓 (Sp) の全細胞数。骨髄は 1 つの大腿骨あたりの細胞数を示した。 ** $P < 0.005$ vs Control ($n = 8-10$)。 (d) 12 週齢の雄の ISAM とコントロールマウスの脾臓重量 ($n = 3-5$)。両マウスの平均 Hct をグラフバー内に示した。重度の貧血に関わらず、ISAM の脾臓重量はコントロールの脾臓と比べて同程度わずかに減少した。

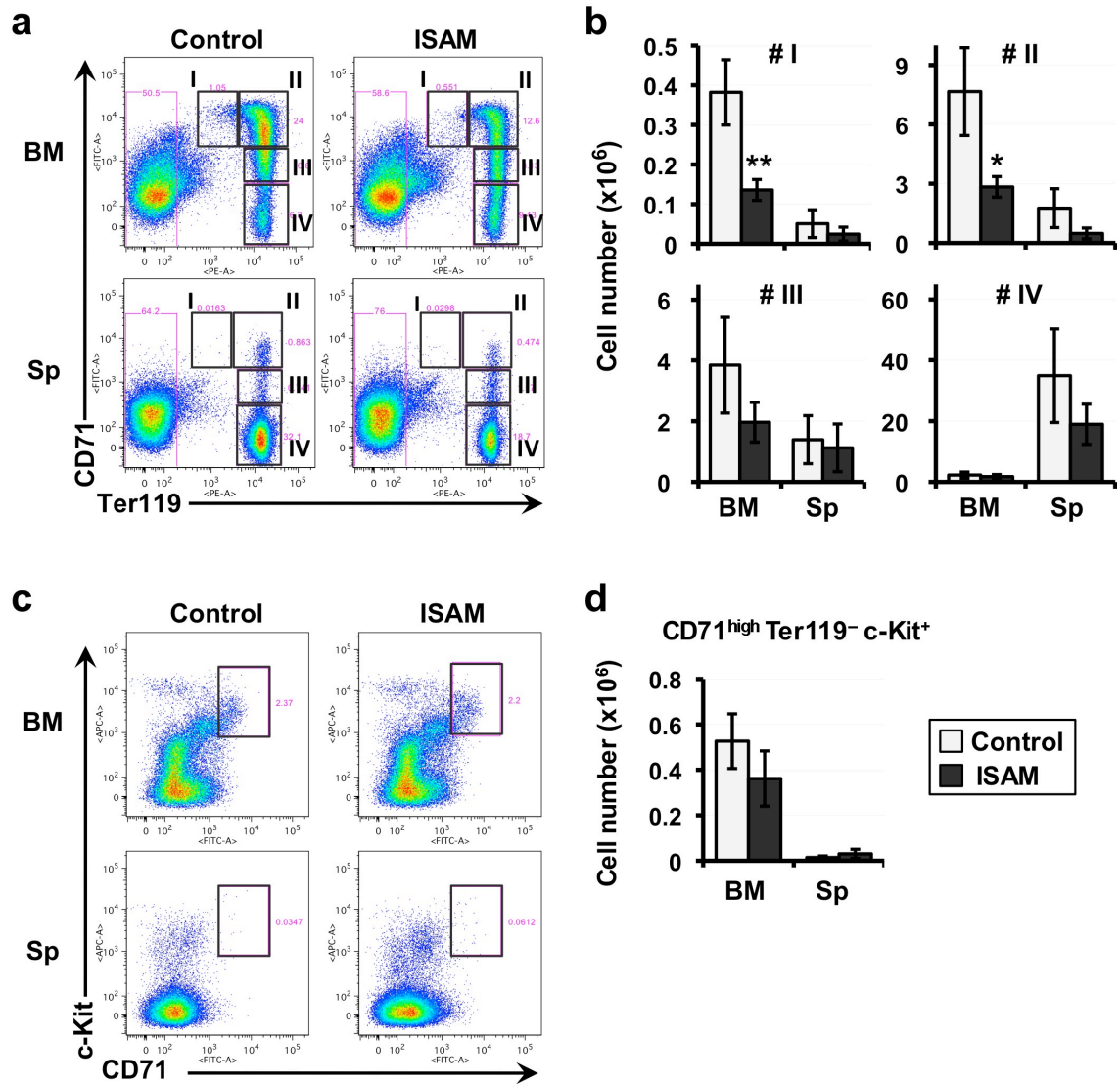


図 8. ISAM の骨髄において Epo 欠損により早期の赤芽球が減少する

(a) 12 週齢の ISAM とコントロールマウス ($Epo^{+/-}$ および $Epo^{+/-}; Tg^{458}$) の骨髄 (BM) と脾臓 (Sp) の細胞を CD71 と Ter119 の発現で展開したフローサイトメトリー解析の代表的データ。赤血球系細胞を 4 つの画分 (I、II、III および IV) に分けた。(b) I から IV の各赤血球系画分の細胞数。* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ vs Control ($n = 3-5$)。 (c) Ter119 陰性画分を CD71 と c-Kit の発現で展開したフローサイトメトリー解析の代表的データ。(d) CD71^{high}Ter119⁻c-Kit⁺画分 (c の四角) の細胞数。* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ vs Control ($n = 3-5$)。異なる独立した実験から同様の結果が得られている ($n = 5$)。

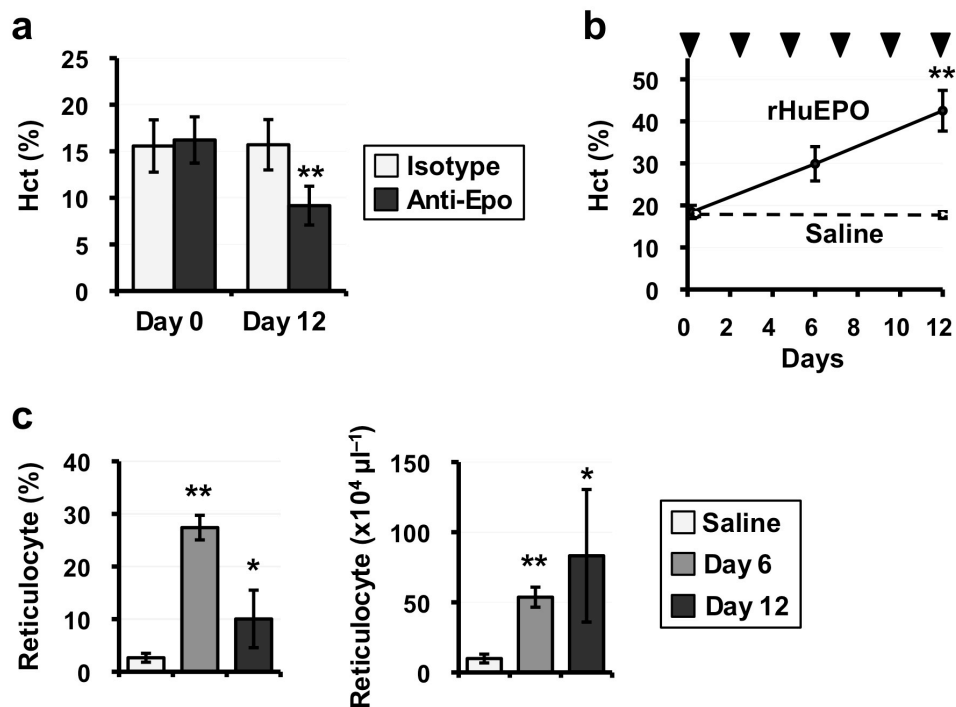


図 9 ISAM は内在性および外来性の Epo に正常な反応性を示す

(a) 7 から 8 週齢の ISAM に抗 Epo 中和抗体またはアイソタイプ抗体 (200 μg) を腹腔内に 1 日おきに投与したときの投与前 (Day 0) と投与 12 日後 (Day 12) の Hct. ** $P < 0.005$ vs Control ($n = 6$). (b) 11 から 15 週齢の ISAM に rHuEPO (体重 kg あたり 3,000 単位) または相当量の生理食塩水を腹腔内に 1 日おきに投与したときの投与前 (Day 0)、投与 6 日後 (Day 6) および 12 日後 (Day 12) の Hct. ** $P < 0.005$ vs Saline ($n = 4$). (c) rHuEPO 投与 6 日後と 12 日後における網状赤血球の割合と数。生理食塩水投与の 12 日後におけるデータをコントロールとした (Saline). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ vs Saline ($n = 4$).

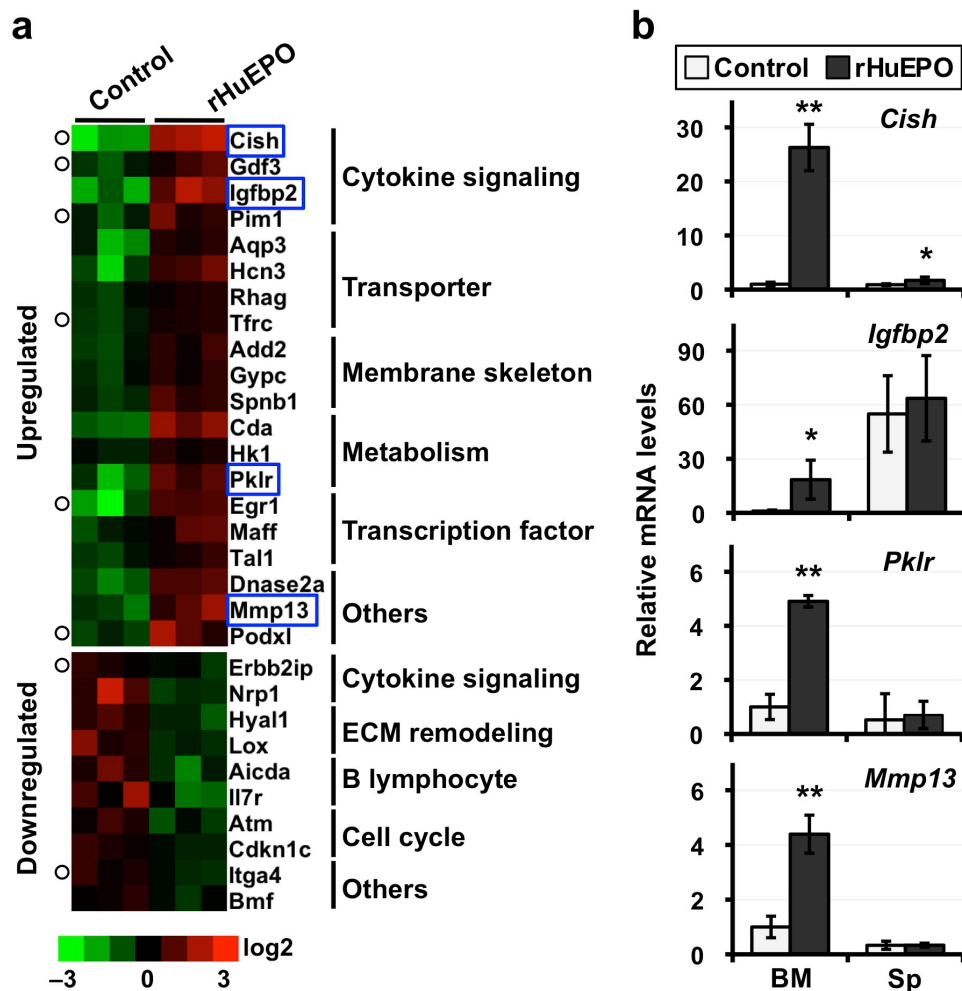


図 10 ISAM の骨髄における Epo 反応性遺伝子を同定した

(a) rHuEpo (体重 kg あたり 3,000 単位) を投与して 6 時間後の ISAM の骨髄における mRNA 発現変化を示したヒートマップデータ。マイクロアレイ解析において rHuEPO 投与群とコントロール群 (各群 $n = 3$) で 1.5 倍以上の変化を示した遺伝子の中で、代表的な 30 遺伝子を機能別に分類して並べた。ECM は細胞外基質 (extracellular matrix)。白丸は以前に報告された Epo 反応性の赤血球系遺伝子。コントロール群には PBS 投与 ($n = 2$) または非投与 ($n = 1$) の ISAM を用いた。 (b) RT-qPCR 解析により rHuEPO 投与 6 時間後の ISAM の骨髄 (BM) と脾臓 (Sp) における *Cish*、*Igfbp2*、*Pklr* および *Mmp13* mRNA (a に青四角で囲んだ) の発現レベルを定量した。結果はコントロール群の骨髄の発現レベルを 1 としたときの相対値で表した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ vs Control ($n = 3-5$)。

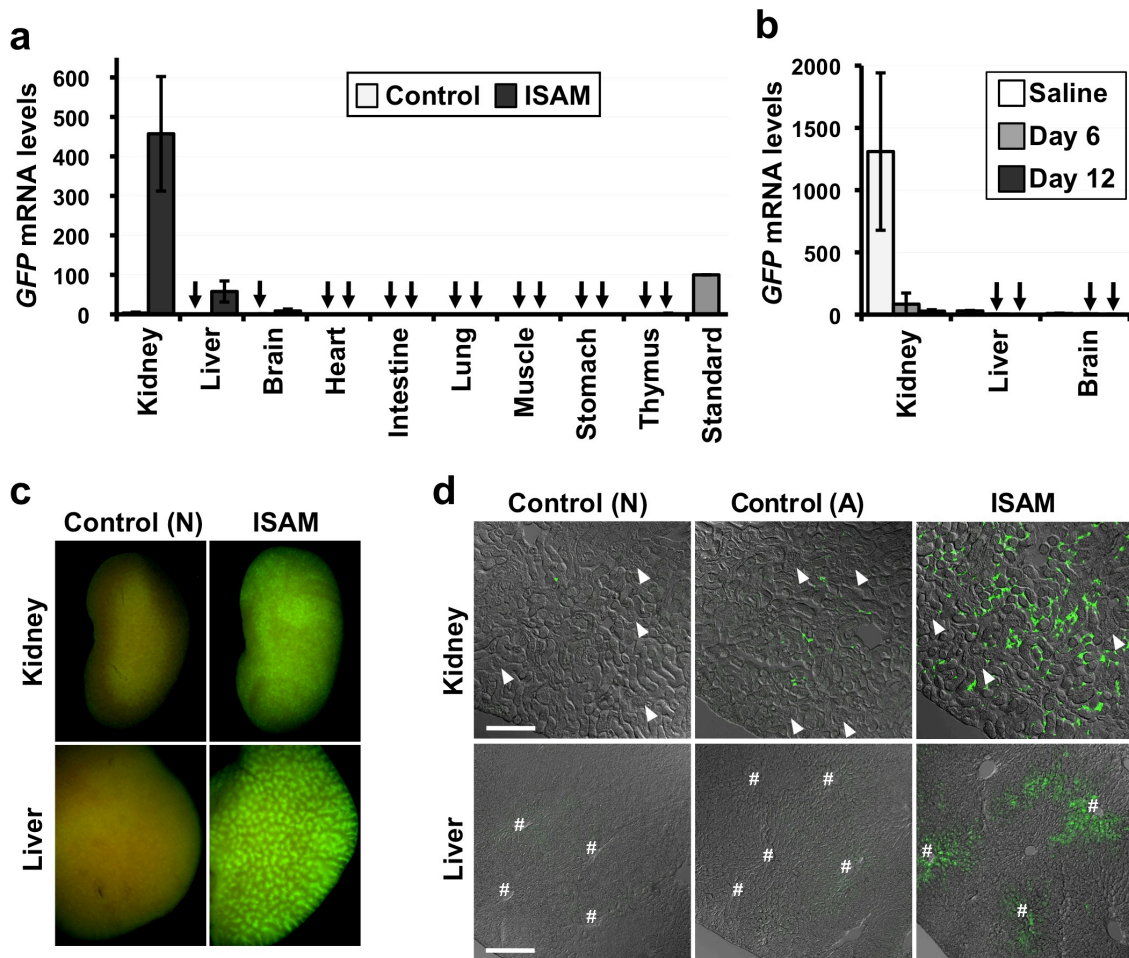


図 11. ISAM の慢性重度貧血により Epo 産生細胞の GFP 発現が誘導される

(a) 12 週齢の ISAM と $Epo^{+/-}$ マウス (Control) の各臓器における GFP mRNA 発現レベル。結果は標準サンプル (貧血の $Epo^{+/-}$ マウス腎臓) の発現レベルを 100 (灰色バー) としたときの相対値で表した ($n = 3$)。矢印は検出限界以下の発現レベル。(b) 12 週齢の ISAM を rHuEPO 投与により貧血から回復させたときの腎臓、肝臓および脳における GFP mRNA 発現レベル ($n = 4$)。生理食塩水投与 12 日後の ISAM をコントロールに用いた (Saline)。このときの Hct は図 9b に示した。(c) ISAM と $Epo^{+/-}$ マウス (Control) の腎臓と肝臓における GFP 蛍光の発現。(d) ISAM と通常 (N) または急性貧血 (A) 状態の $Epo^{+/-}$ マウス (Control) の腎臓皮質 (上段) と肝臓 (下段) における GFP 標識された Epo 産生細胞の分布。ISAM の腎臓において GFP 標識された REP 細胞は皮質の深部 (右上) から皮膜直下 (左下) にまで広がって見つかった (矢印は糸球体)。ISAM の肝臓では、中心静脈 (#) 周囲の多数の肝実質細胞が GFP を発現した。スケールバーは 200 μm 。

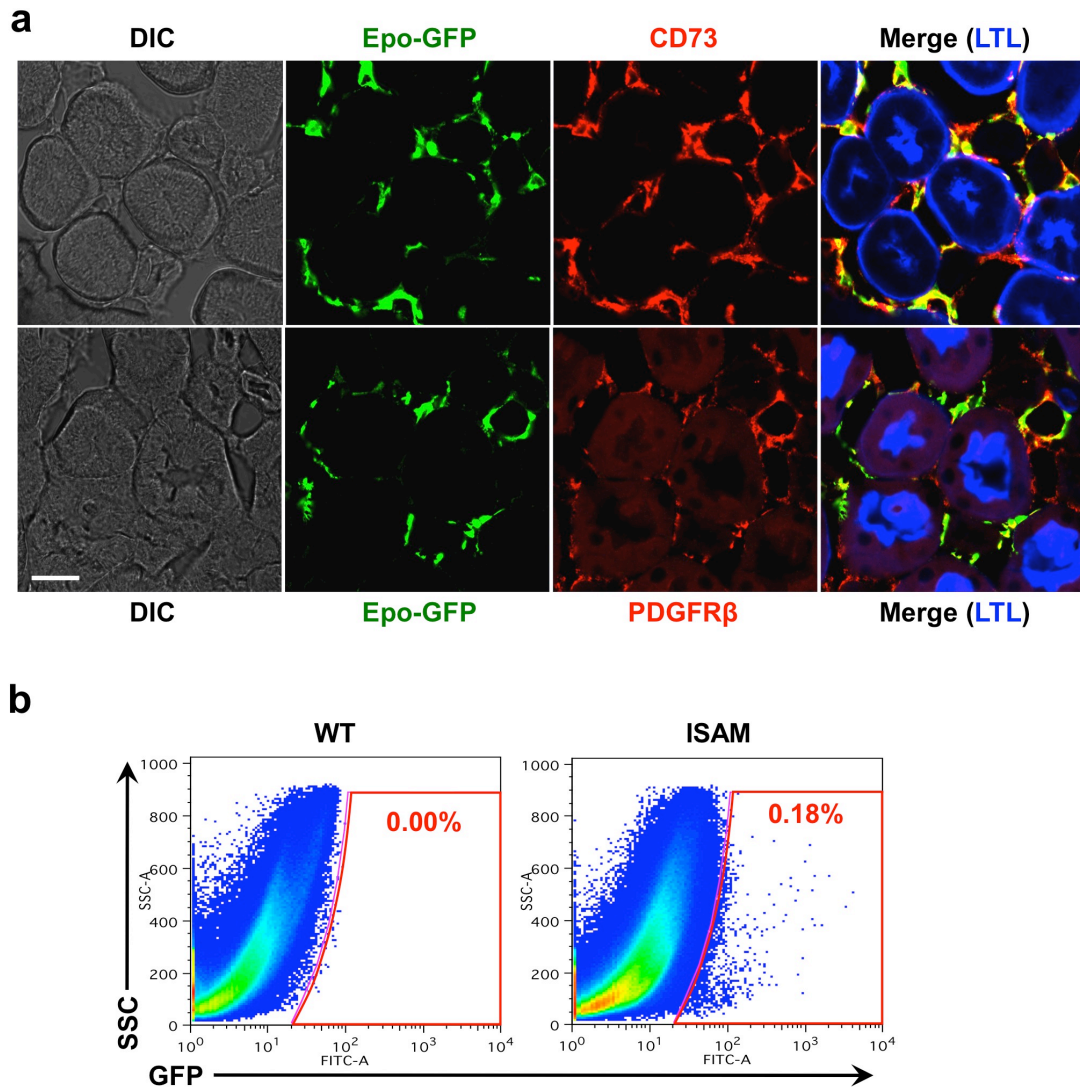


図 12. ISAM の腎臓における GFP 標識された REP 細胞

(a) ISAM の腎臓における GFP 標識された REP 細胞の免疫染色解析。GFP 陽性の REP 細胞（緑）は、*Lotus Tetragonolobus* Lectin (LTL) により染色される近位尿細管（青）の間質部位に位置し、CD73（赤、上段）と PDGFRβ（赤、下段）を発現する。DIC は微分干渉像（differential interference contrast microscope）。スケールバーは 20 μm 。 (b) ISAM の腎臓の単一細胞懸濁液を GFP 発現と側方散乱（SSC）で展開したフローサイトメトリー解析の代表的データ。GFP 陽性細胞の割合（赤い領域）を示した。

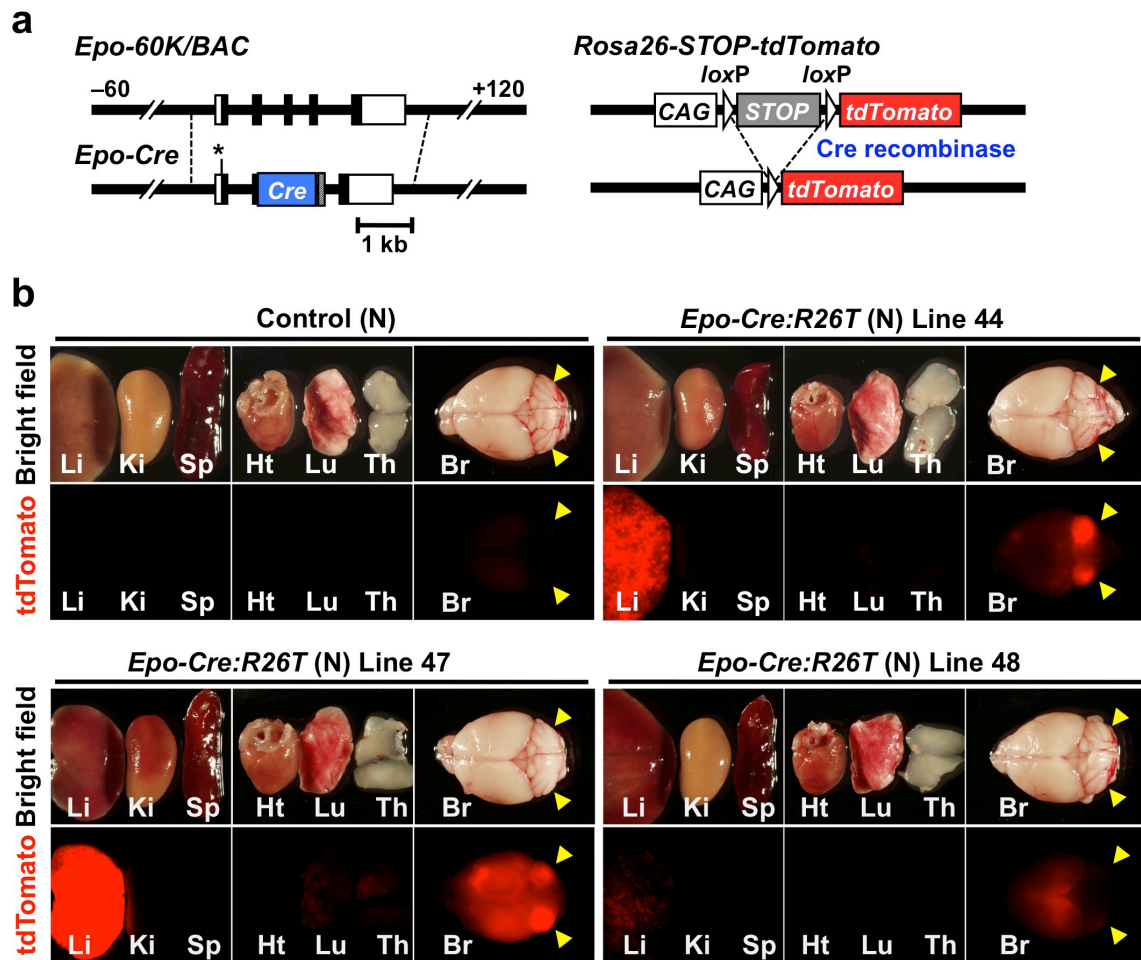


図 13. *Epo-Cre:Rosa26-STOP-tdTomato* マウスによる Epo 産生細胞の永久標識
 (a) *Epo-Cre* トランスジーン の構築 (左) と *Rosa26-STOP-tdTomato* (R26T) マウスに
 よる Cre 組換えのレポーターシステム (右)。マウス *Epo* 遺伝子の上流 60-kb から下
 流 120-kb までの領域を含む BAC クローン (*Epo-60K/BAC*) に *Cre* cDNA を組み込ん
 だ。また第 I エクソンの開始コドンに変異を入れ (*), *Cre* cDNA の開始コドンから
 翻訳が始まるようにした。*Rosa26-STOP-tdTomato* アリルの *loxP* 配列で挟まれた *STOP*
 領域が Cre 組換えにより除去された細胞では、*CAG* プロモーターによる恒常的
tdTomato 発現が引き起こされる。(b) *Epo-Cre:R26T* マウス (44、47 および 48 系統)
 と R26T マウス (Control) の通常状態 (N) における各臓器の *tdTomato* 蛍光の発現。
 肝臓 (Li)、腎臓 (Ki)、脾臓 (Sp)、心臓 (Ht)、肺 (Lu)、胸腺 (Th)、脳 (Br)、矢
 頭は小脳。

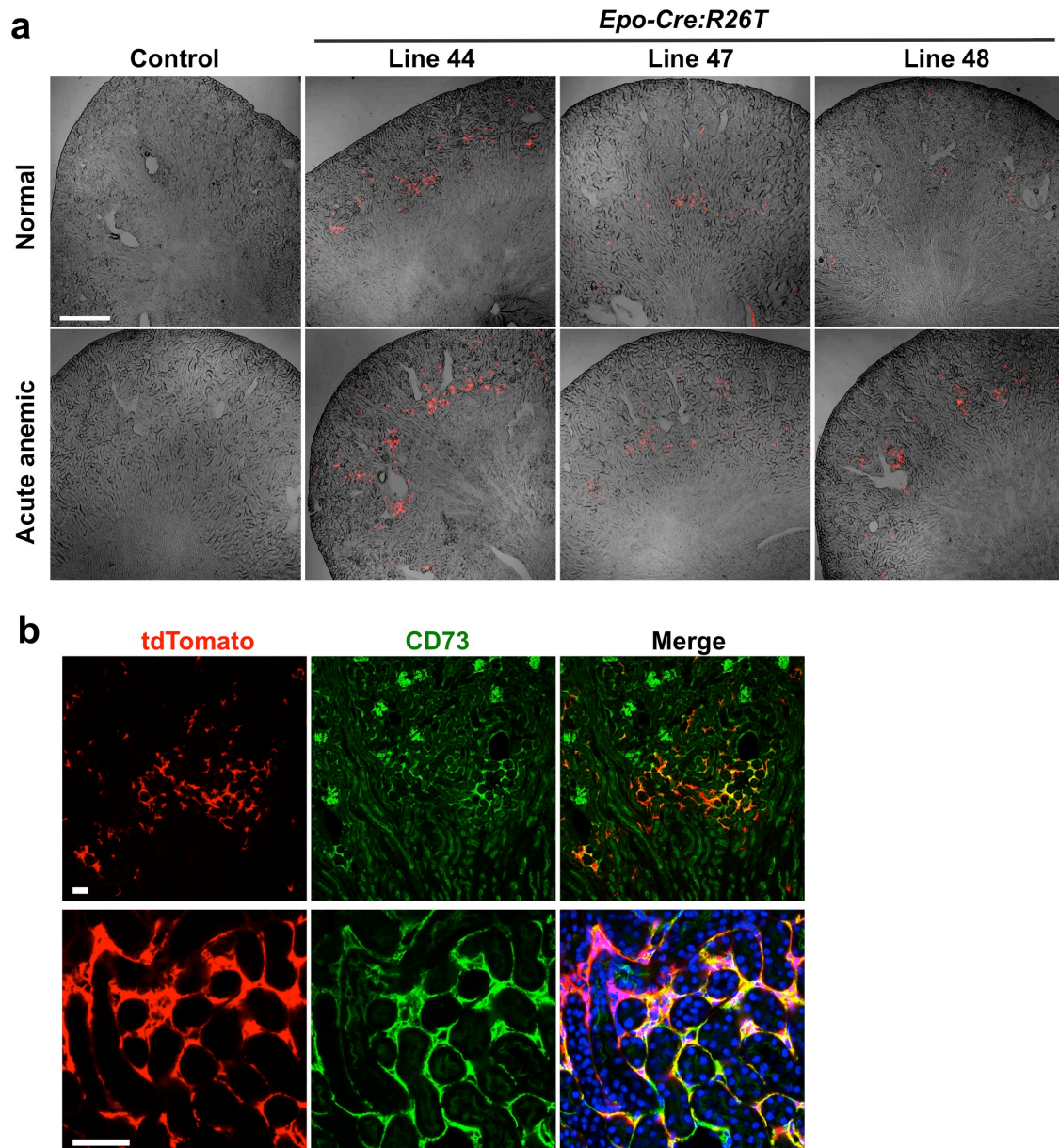


図 14. *Epo-Cre:R26T* マウスの腎臓における tdTomato 陽性細胞

(a) *Epo-Cre:R26T* マウス (44、47 および 48 系統) と *R26T* マウス (Control) の通常 (上段) または急性貧血 (下段) 状態における腎臓の tdTomato 蛍光の発現。主に皮髄境界周辺の間質領域において tdTomato 発現細胞を認めた。スケールバーは 500 μm 。(b) *Epo-Cre:R26T* マウス (44 系統) の急性貧血状態における腎臓の tdTomato 陽性細胞の免疫染色解析。tdTomato 標識細胞 (赤) は尿細管間質の CD73 発現細胞 (緑) と重なった。弱拡大 (上段) と強拡大 (下段) の画像を示した。下段右のパネルでは DAPI により核を染色した (青)。スケールバーは 50 μm 。

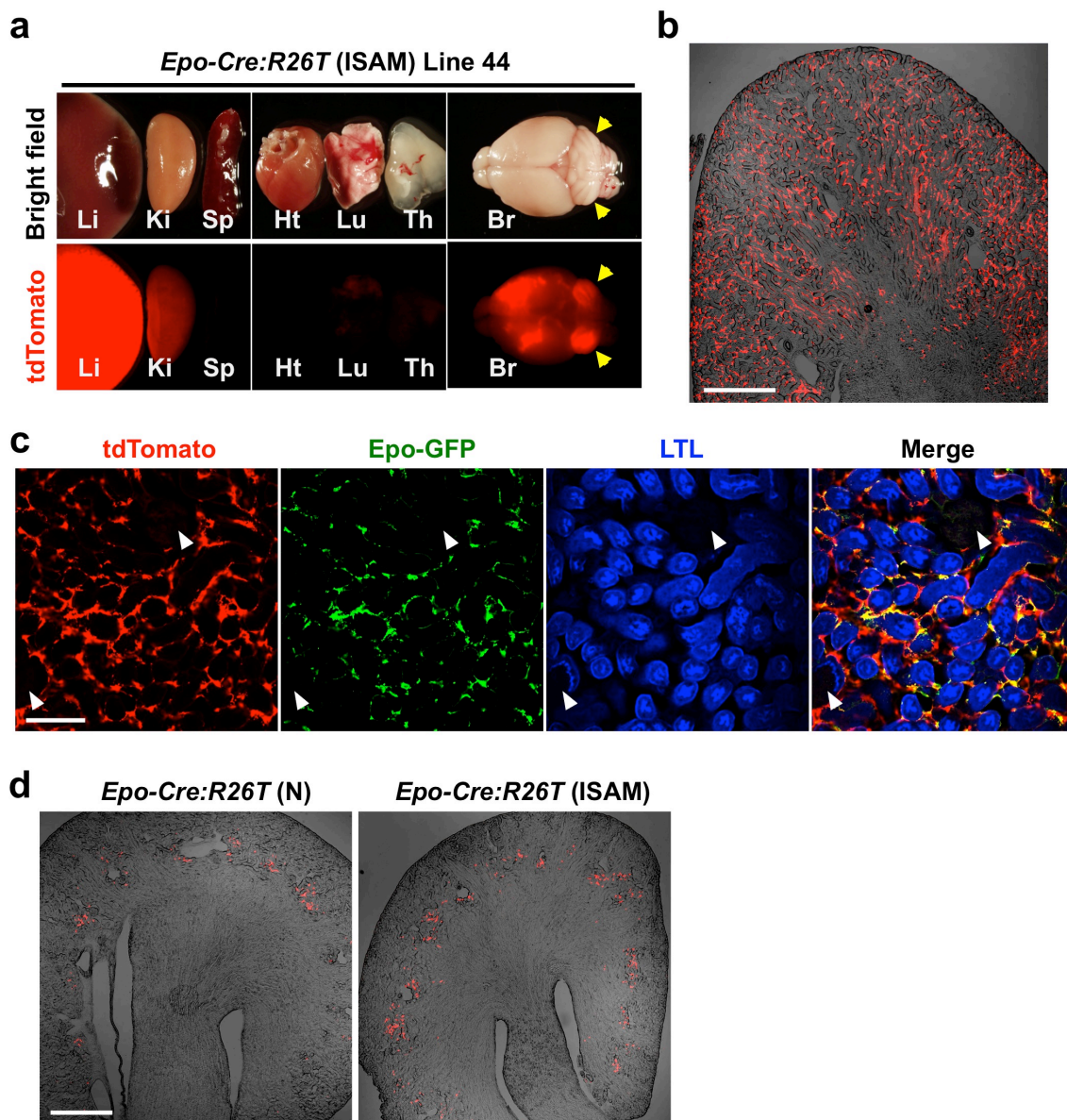


図 15. ISAM の重度慢性貧血による *Epo-Cre* 組換えの誘導

(a) ISAM:*Epo-Cre:R26T* 複合マウス (44 系統) の各臓器における tdTomato 蛍光の発現。肝臓 (Li)、腎臓 (Ki)、脾臓 (Sp)、心臓 (Ht)、肺 (Lu)、胸腺 (Th)、脳 (Br)、矢頭は小脳。 (b) ISAM:*Epo-Cre:R26T* 複合マウス (44 系統) の腎臓における tdTomato 陽性細胞の分布。スケールバーは 500 μm 。 (c) ISAM:*Epo-Cre:R26T* 複合マウス (44 系統) の腎皮質における tdTomato 陽性細胞の免疫染色解析。GFP 標識された REP 細胞 (緑) は tdTomato 発現細胞 (赤) と重なる。LTL により染色された尿細管 (青) 間質部位における多数の線維芽細胞が tdTomato 発現陽性であった。矢頭は糸球体。スケールバーは 100 μm 。 (d) 2 週齢の ISAM:*Epo-Cre:R26T* 複合マウス (44 系統) の腎臓における tdTomato 発現。同腹の *Epo*^{+/-}:*Tg*⁴⁵⁸:*Epo-Cre:R26T* マウスをコントロールバックグラウンド (N) に用いた。スケールバーは 500 μm 。

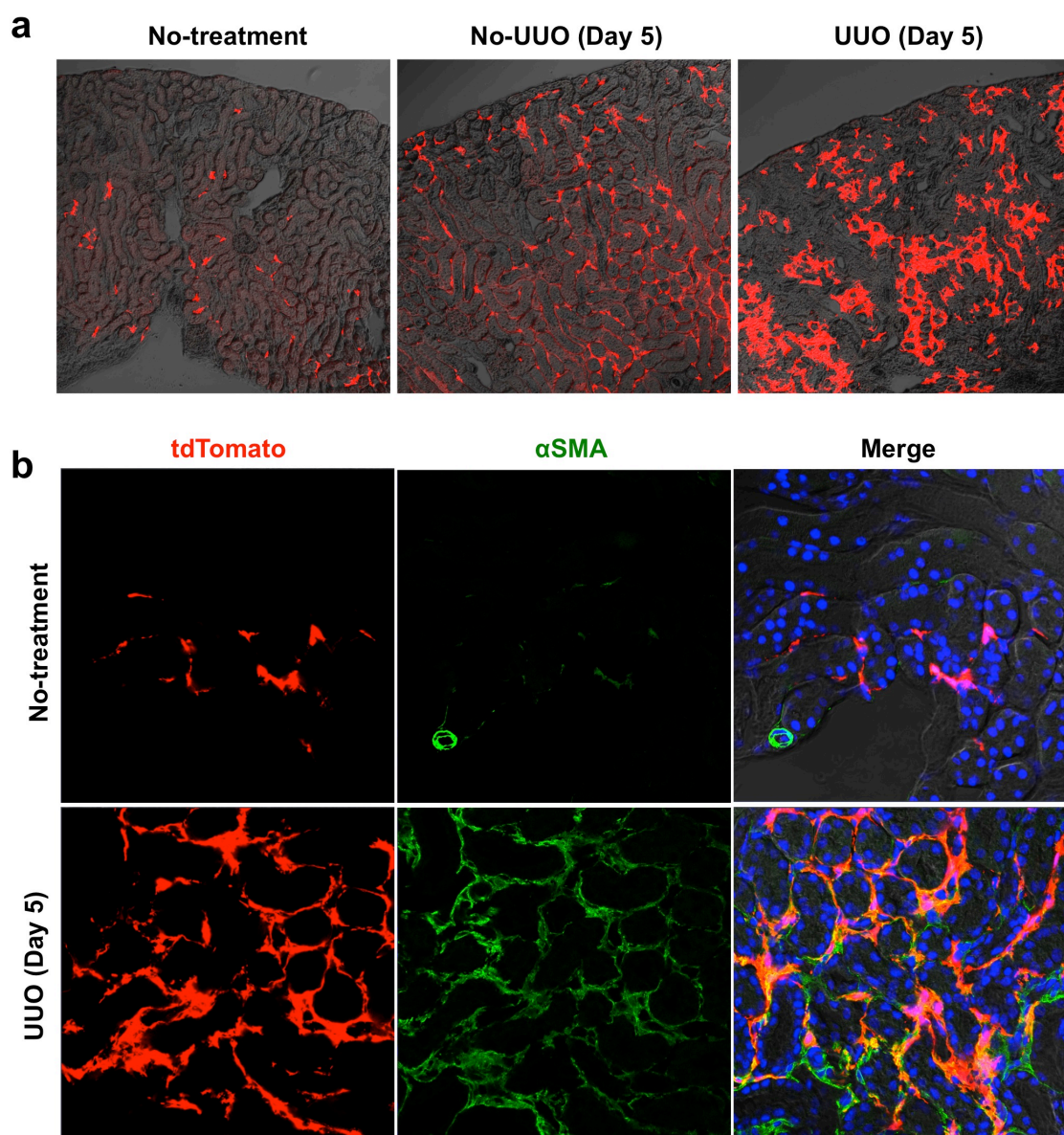


図 16. UUO 5 日後の *Epo-Cre:R26T* マウスの腎臓における tdTomato 陽性細胞
(a) *Epo-Cre:R26T* マウス (44 系統) を急性貧血に誘導した後、UUO を行い 5 日後に結紮側 (UUO) と対側 (No-UUO) の腎臓を解析した。**(b)** UUO 側の tdTomato 陽性細胞 (赤) における筋線維芽細胞マーカーの発現 (α SMA, 緑) を蛍光免疫染色により解析した。DAPI により核を染色した (青)。

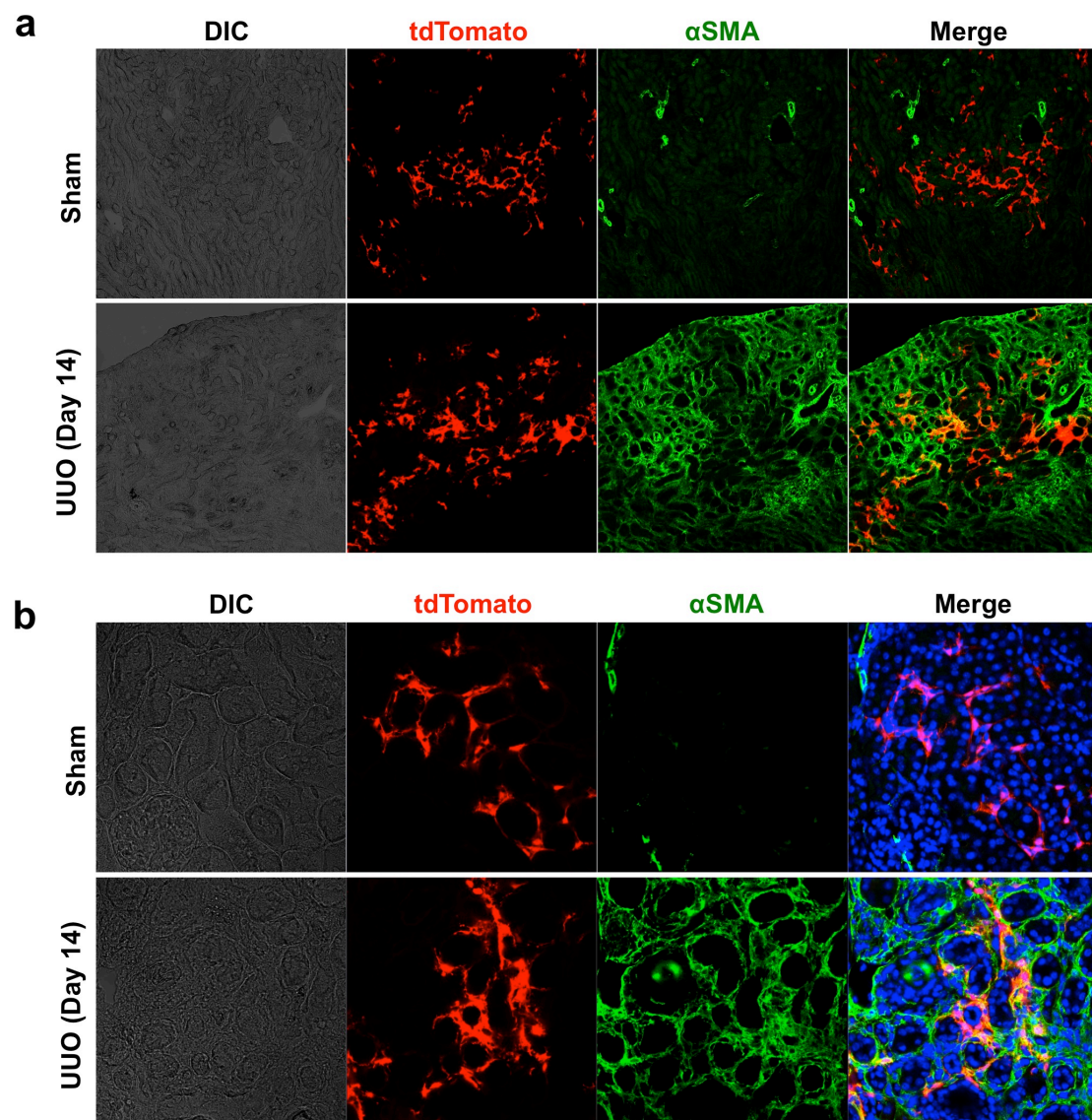


図 17. UUO 14 日後の *Epo-Cre:R26T* マウスの腎臓における tdTomato 陽性細胞
(a) *Epo-Cre:R26T* マウス (44 系統) を急性貧血に誘導した後、UUO を行い 14 日後に結紮側 (UUO) の腎臓を解析した。Sham 群 (Day 14) をコントロールに用いた。**(b)** UUO 側の tdTomato 陽性細胞 (赤) における筋線維芽細胞マーカーの発現 (α SMA, 緑) を蛍光免疫染色により解析した。DAPI により核を染色した (青)。

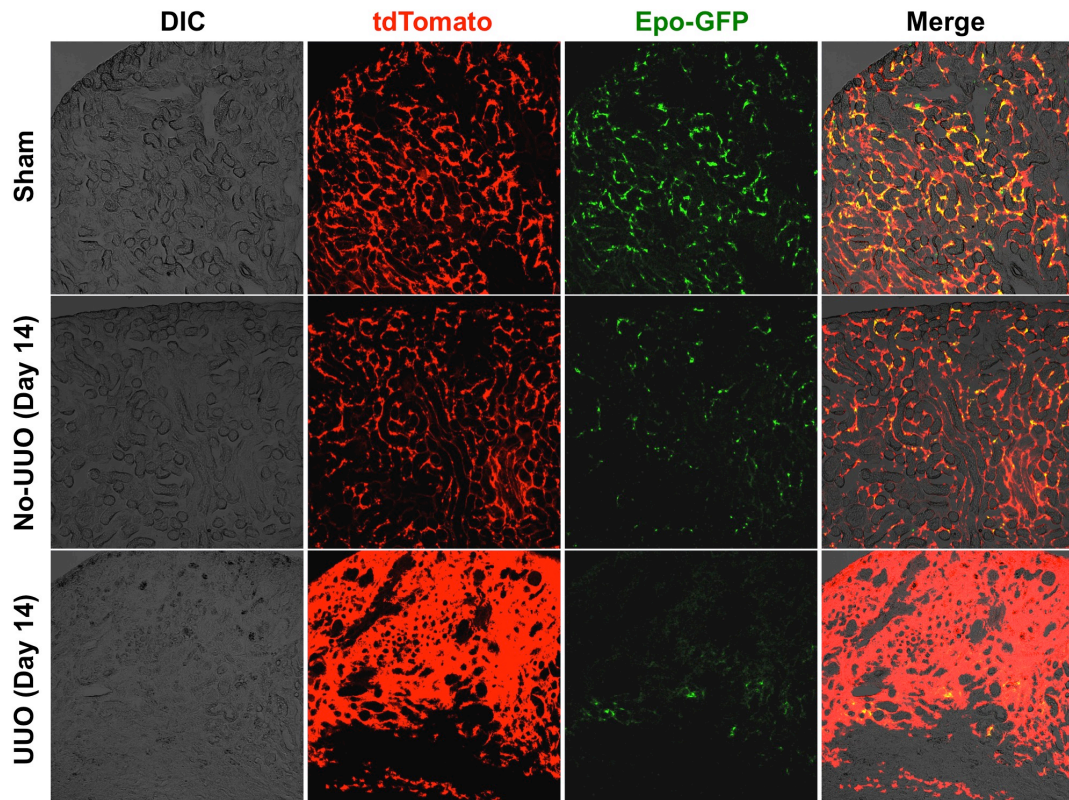







図 18. UUO 14 日後の ISAM:*Epo-Cre:R26T* マウスの腎臓における REP 細胞
 ISAM:*Epo-Cre:R26T* マウス (44 系統) に UUO を行い、14 日後に結紮側 (UUO) と
 対側 (No-UUO) の腎臓を解析した。*Epo* 遺伝子座からの GFP 発現 (緑) を蛍光免疫
 染色により解析した。腎皮質の線維化は、tdTomato 標識された REP 細胞により形成
 される。

	WT	Epo KO $\xrightarrow{+Tg-Epo}$ ISAM	
Fetus	Liver Epo 	Liver Epo 	Liver Epo 
Adult	Kidney Epo 	Embryonic lethal	Kidney Epo  Epo-deficiency anaemia

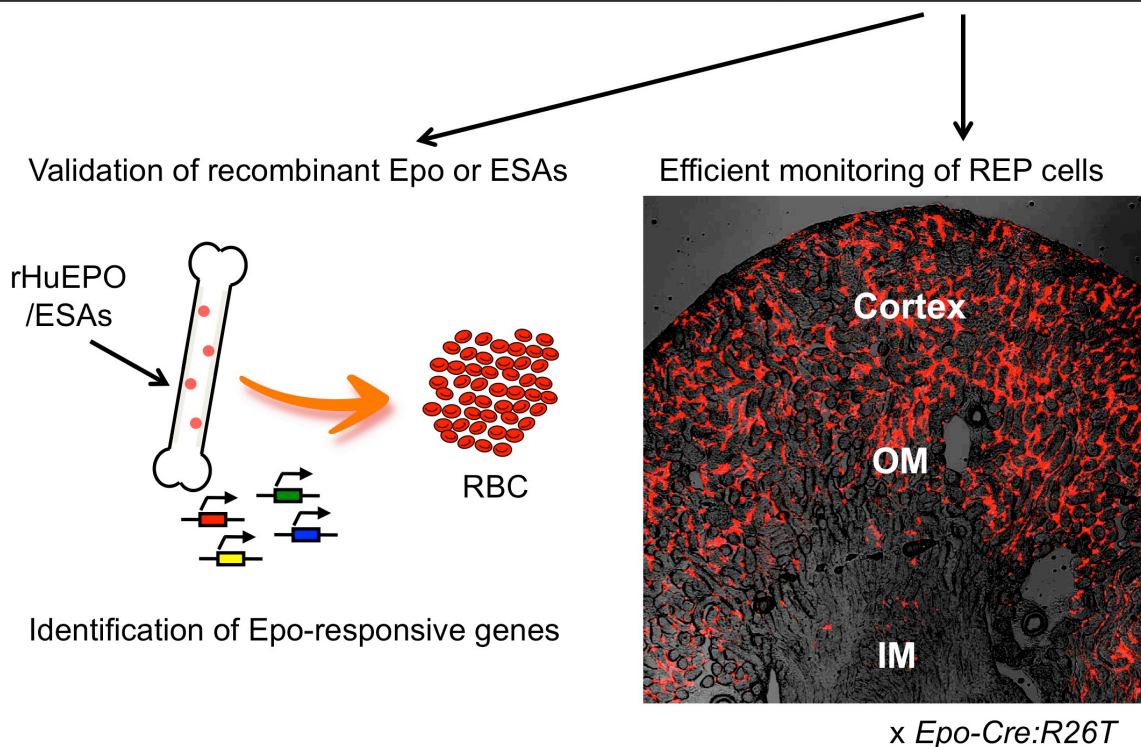


図 19. ISAM の樹立と Epo の造血機能と産生制御の解析への応用

通常のマウス (WT) は、胎生期に肝臓が、成体では腎臓が主に Epo を産生する。Epo 遺伝子欠失 (KO) マウスは肝臓の Epo 発現を失い、貧血により胎生期に死亡する。今回、Epo KO マウスの肝臓の Epo 発現を回復させることにより、成体で腎臓の Epo 発現能を失った Epo 欠損貧血のモデルマウス (ISAM) を作成した。このマウス系統により、1) 組換え Epo 製剤や ESAs の動物レベルにおける評価、2) Epo シグナルに反応する遺伝子群の同定、3) REP 細胞の効率的な観察が可能となった。OM は髄質外層、IM は髄質内層。

10. 表

表 1. 遺伝子型決定に使用したプライマーの配列情報

プライマー	配列 (5' > 3')	用途
GFP-cs	ACTCTCGGCATGGACGAGCTG	<i>Epo</i> ノックアウトアリの検出
Epo-RTR	GTGAGTGTTTCGGAGTGGAGCAGG	
Epo-5UTRs	ACAGGAAGGTCTCACATAGCC	3.3K- <i>Epo3'</i> トランスジーンを検出
Epo-s5	TACAGCTAGGAGAGTTGTGTGG	
Epo-5UTRs	ACAGGAAGGTCTCACATAGCC	野生型 <i>Epo</i> 遺伝子座を検出
Epo-B6as	TGGGGAAACCCCATGAGATC	
Epo-exon4F	CCTGTCCCTGCTCTCAGAAG	3.3K- <i>Epo3'</i> トランスジーンのコピー数
Epo-exon4R	AGCTGAAGGGTCTCTGGTGG	
Gata2-F	GCCCTGTACAACCCATTCTC	コピー数解析の内部標準
Gata2-R	TTGTTCCCGGCGAAGATAAT	
Cre-F	ACGTTACCGGCATCAACGT	<i>Epo-Cre</i> トランスジーンを検出
Cre-R	CTGCATTACCGGTCGATGCA	
R26T-F	CTGTTCTGTACGGCATGG	<i>Rosa26-tdTomato</i> アリの検出
R26T-R	GGCATTAAGCAGCGTATCC	

表 2. RT-PCR 解析に使用したプライマーとプローブの配列情報

プライマー ／プローブ	配列 (5' > 3')	用途
Epo-4:5RTs	GGTACTGGGAGCTCAGAAGG	RT-PCR for endogenous <i>Epo</i> mRNA
Epo-B6as	TGGGGAAACCCCATGAGATC	
Epo-4:5RTs	GGTACTGGGAGCTCAGAAGG	RT-PCR for transgene <i>Epo</i> mRNA
Epo-dE1as	CTCGTGCTGTCTGGGGAAAG	
EpoGFP-s	GAAGACTTGCAGCGTGGAC	RT-qPCR for <i>Epo-GFP</i> mRNA
EpoGFP-as	GGTGGATCCTAAAGCAGCAG	
Epo-qRT-F	GAGGCAGAAAATGTCACGATG	RT-qPCR for <i>Epo</i> mRNA
Epo-qRT-R	CTTCCACCTCCATTCTTTTCC	
Epo-qRT-P	TGCAGAAGGTCCCAGACTGAGTGAAAATA	(5'-FAM, 3'-TAMRA)
18S rRNA-F	CGGCTACCACATCCAAGGAA	Internal control of RT-qPCR
18S rRNA-R	GCTGGAATTACCGCGGCT	
18S rRNA-P	TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC	(5'-FAM, 3'-TAMRA)
Cish-F	GACATGGTCCTTTGCGTACA	RT-qPCR for <i>Cish</i> mRNA
Cish-R	GAATGCCCCAGTGGGTAAGG	
Pklr-F	GTGGAGGCTTCCTTCAAGTG	RT-qPCR for <i>Pklr</i> mRNA
Pklr-R	AGGTCGGTAGCGAGACAGAA	
Mmp13-F	GCCAGAACTTCCCAACCAT	RT-qPCR for <i>Mmp13</i> mRNA
Mmp13-R	TCAGAGCCCAGAATTTTCTCC	
Igfbp2-F	GCGGGTACCTGTGAAAAGAG	RT-qPCR for <i>Igfbp2</i> mRNA
Igfbp2-R	CCTCAGAGTGGTCGTCATCA	
Cre-F	ACGTTACCGGCATCAACGT	Genotyping of <i>Epo-Cre</i> transgene
Cre-R	CTGCATTACCGGTCGATGCA	
R26T-F	CTGTTCTGTACGGCATGG	Genotyping of <i>Rosa26-tdTomato</i> allele
R26T-R	GGCATTAAAGCAGCGTATCC	

表 3. $Epo^{+/-}:Tg$ と $Epo^{+/-}$ マウスの交配から得られた $Epo^{-/-}:Tg$ マウスの産仔数

Tg line	Tg copy No.	Pups	$Epo^{-/-}:Tg$ (%)
444	n.d.	53	0 (0)
458	1	47	10 (21)
475	12	28	3 (11)
476	7	26	3 (12)
523	2	74	10 (14)
524	100	11	2 (18)
620	60	9	4 (44)
621	1	58	0 (0)
622	30	20	4 (20)
623a	10	23	7 (30)
623b	20	8	2 (25)
Total		357	45 (13)
Expected			51 (14)

表 4. ISAM ($Epo^{-/-}:Tg^{458}$) を用いた交配から得られた産仔数

Crossing	Parents	Litter	Pups	Genotype	Number	(%)
#1	(M) $-/-:Tg^{458}$	72	423	$+/-$	146	(35)
	(F) $+/-$			$+/-:Tg^{458}$	154	(36)
				$-/-$	0	(0)
				$-/-:Tg^{458}$	123	(29)
#2	(M) $-/-:Tg^{458}$	3	27	$-/-$	0	(0)
	(F) $-/-:Tg^{458}$			$-/-:Tg^{458}$	17	(63)
				$-/-:Tg^{458/458}$	10	(37)
#3	(M) $-/-:Tg^{458/458}$	24	167	$+/-:Tg^{458}$	87	(52)
	(F) $+/-$			$-/-:Tg^{458}$	80	(48)

M, 雄; F, 雌

11. 謝辞

本研究を進めるにあたり御指導を賜りました東北大学医学系研究科 山本雅之教授に心より御礼申し上げます。また、懇切な研究の御指導と御助言を頂きました鈴木教郎博士には、心より感謝を申し上げます。腎臓学の基礎から腎臓病の実験および解析まで御指導賜りました相馬友和博士、また実験の御指導と御助言を頂いた峯岸直子教授および潘小青博士に感謝の意を表します。最後に、実験に御協力頂き研究生活においてもお世話になりました東北大学医化学分野の研究室の方々に深く御礼申し上げます。